Année Scolaire
1972 - 1973
N° d'ordre : 4

THÈSES

présentées

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Bala Moussa DAFFÉ
PHARMACIEN
C.E.S. de Contrôle physico-chimique des médicaments
C.E.S. de Pharmacie Industrielle
et Diplôme de l'Institut d'administration des Entreprises (CA.A.E.)
C.E.S. de Physiologie végétale
Assistant à l'Université de Dakar associé à l'Université de Bordeaux II
Ancien Interne des Hôpitaux de Dakar
né le 29 Octobre 1940 à SÉDHIOU (Sénégal)

1ère Thèse : Recherches sur la flore médicinale du Sénégal

- Antiaris africana Engl. *(Moracées)*
- Combretum glutinosum Perr.
- Combretum micranthum G. Don } *(Combrétacées)*

2me Thèse : La chimiothérapie antituberculeuse

Présentées et Soutenues publiquement le 19 Novembre 1973
devant la Commission d'Examen

MM. P. MESNARD, Professeur ..... Président

J. MASQUELIER, Professeur .....
R. GOLSE, Professeur ..... } à l'Université
R. CROCKET, professeur ..... } de Bordeaux II
G. DEVAUX, Professeur. ..... } Juges

O. SYLLA, Professeur ..... } à l'Université
J. KERHARO, Professeur ..... } de Dakar

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549625_0027

Année Scolaire
1972 - 1973
N° d'ordre : 4

THÈSES

présentées

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unité d'Enseignement et de Recherches des Sciences pharmaceutiques

pour

LE DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Bala Moussa DAFFÉ
PHARMACIEN
C.E.S. de Contrôle physico-chimique des médicaments
C.E.S. de Pharmacie Industrielle
et Diplôme de l'Institut d'administration des Entreprises (CA.A.E.)
C.E.S. de Physiologie végétale
Assistant à l'Université de Dakar associé à l'Université de Bordeaux II
Ancien Interne des Hôpitaux de Dakar
né le 29 Octobre 1940 à SÉDHIOU (Sénégal)

1ere Thèse : Recherches sur la flore médicinale du Sénégal

- Antiaris africana Engl. *(Moracées)*
- Combretum glutinosum Perr. } *(Combrétacées)*
- Combretum micranthum G. Don }

2me Thèse : La chimiothérapie antituberculeuse

Présentées et Soutenues publiquement le 19 Novembre 1973
devant la Commission d'Examen

MM. P. MESNARD, Professeur			Président
J. MASQUELIER, Professeur	à l'Université de Bordeaux II		Juges
R. GOLSE, Professeur			
R. CROCKET, professeur			
G. DEVAUX, Professeur.			
O. SYLLA, Professeur	à l'Université de Dakar		
J. KERHARO, Professeur			

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A NOTRE PAYS LE SENEGAL

Merci pour tout.

Je jure de ne jamais faillir au devoir qui m'attend et qui ne sera jamais à la mesure des droits dont j'ai bénéficiés.

A MES PARENTS

Vous avez tout sacrifié à l'éducation de vos enfants. Puisse Dieu nous faire bénéficier longtemps encore de votre Sagesse.
Recevez ce modeste travail en gage de ma profonde reconnaissance et de mon très profond amour filial.

A MA FEMME et A TOUS LES SIENS

Avec toute ma tendresse.

A MES FRERES et SŒURS

A MES ONCLES et TANTES

A MES COUSINS et COUSINES

A MES NEVEUX et NIECES

A MES AMIS

de toujours qui ont marqué toutes les étapes de ma vie scolaire et professionnelle

- A l'Ecole primaire communale de Sédhiou
- Au Lycée Van Vollenhoven
- Au Lycée Maurice DELAFOSSE
- A l'Université de DAKAR
- A l'Hôpital A. Le DANTEC
- A l'Université de BORDEAUX II

A MES MAITRES de l'Université de DAKAR

et de l'Université de BORDEAUX

A Monsieur H.P. HUSSON

Maître de Recherches au C N R S

et Monsieur J. MICHAUD

Laboratoire de Matière médicale Bordeaux II

Dont les conseils nous été si précieux dans la réalisation de ce travail.
Très sincères remerciements.

A TOUT LE PERSONNEL DES LABORATOIRES de :

.Contrôle physico-chimique des Médicaments et de Chimie Organique de l'Université de Bordeaux II

.Matière médicale de l'Université de Bordeaux II

.Pharmacie Industrielle de l'Université de Bordeaux II

.Chimie des Substances naturelles du CNRS de Gif/Yvette

.Biologie végétale de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Poitiers

.Chimie Organique et Pharmacie chimique de l'Université de DAKAR

.Biologie végétale et Matière médicale de l'Université de DAKAR

A TOUS CEUX

qui ont contribué avec désintéressement à la réalisation de ce travail :

.L'Etat Sénégalais

.L'Organisation Mondiale de la Santé

.L'Université de DAKAR

.L'Université de BORDEAUX II

.Les Laboratoires CIBA

.Mademoiselle CHASSAING

.Bernard S. Miguel

A TOUS CEUX qui nous ont aidé dans nos enquêtes et nos récoltes et que nous ne voulons pas citer de peur d'en oublier.

A NOS JUGES

Vous nous faites beaucoup d'honneur en acceptant de siéger au jury de notre thèse .

Monsieur le Professeur J. KERCHARO

Professeur de Biologie végétale
et de Matière médicale à l'Université de Dakar

Nous aurons l'honneur et la chance de pouvoir bénéficier bientôt de votre enrichissante collaboration.

Monsieur le Professeur O. SYLLA

Professeur de Chimie organique
et de Pharmacie chimique à l'Université de Dakar

Vous nous avez suivi et conseillé tout au long de nos études. Vous nous avez accueilli avec bienveillance comme interne et comme assistant dans vos Services à l'Hôpital et à l'Université, en nous témoignant toujours beaucoup d'amitié. Nous vous prions de trouver ici Cher Maître le témoignage de notre profonde et respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur G. DEVAUX

Professeur sans Chaire (Pharmacie chimique)
Licencié ès Sciences

L'intérêt que vous nous avez porté tout au long de notre travail nous a bien souvent permis de surmonter les aléas de la recherche.
Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre admiration.

Monsieur le Professeur R. CROCKETT

Professeur de Biochimie pharmaceutique
Assistant de Biochimie des Hôpitaux de Bordeaux
Licencié ès Sciences

C'est toujours avec beaucoup d'intérêt que nous avons suivi votre enseignement aux CES de Contrôle physico-chimique de Médicaments et de Biochimie clinique. Vos qualités d'enseignant et de chercheur dynamique resteront pour nous un exemple.

Monsieur le Professeur R. GOLSE

Professeur de Chimie générale et minérale
Docteur ès Sciences physiques
Pharmacien des Hôpitaux
Officier des Palmes académiques

Nous avons très souvent sollicité votre aide au cours de nos expérimentations et c'est avec votre bienveillance coutumière que vous nous avez toujours accueilli dans votre la boratoire.
Très sincères remerciements.

Monsieur le Professeur J. MASQUELIER

Directeur de l'U.E.R. de Sciences pharmaceutiques
Professeur de Matière médicale et microbiologie
Officier des Palmes académiques
Chevalier du Mérite agricole
Docteur ès Sciences

Dès le premier entretien que vous avez bien voulu m'accorder j'ai pu mesurer la profondeur de votre Science et apprécier vos grandes qualités de cœur. Malgré vos lourdes charges administratives vous ne vous départissez jamais de votre bonne humeur. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de notre gratitude et de notre profond attachement.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur P. MESNARD

Professeur de Chimie organique et Chimie analytique
Membre correspondant de l'Académie de Pharmacie
Docteur ès Sciences physiques
Inspecteur principal des Pharmacies
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre national du Mérite
Officier des Palmes académiques
Officier de la Santé publique
Médaille de Vermeil du Service de Santé de la Marine
Membre correspondant de la Réal Académia de Farmacia de Madrid et de l'Institut de Coimbra (Portugal)
Membre d'Honneur de la Société de Pharmacie de Bénarès (Inde)

C'est d'abord dans une première correspondance que vous nous avez témoigné votre confiance. Cette lettre pour laquelle nous n'attendions qu'une réponse administrative, nous faisait déjà entrevoir l'homme que vous êtes. Nous n'allions pas tardé à connaître le Maître. Aujourd'hui après quatre ans de votre maîtrise nous pouvons vous avouer que bien souvent,nous avons été au désespoir de ne jamais être à la mesure de l'effort que vous attendiez de nous.

Votre rigueur scientifique, la précision de votre enseignement, votre exigence de l'ordre resteront pour nous des buts à atteindre. En plus vous nous avez séduit par vos qualités humaines, votre sollicitude à notre égard à laquelle s'est associée bien souvent votre famille, a été pour nous d'un grand réconfort moral.

Les mots nous manquent pour vous exprimer notre gratitude.

Soyez assuré de notre indéfectible attachement.

RECHERCHES SUR LA FLORE MEDICINALE DU SENEGAL

Antiaris africana Engl.

Combretum glutinosum Pers.

Combretum micranthum G. Don

Travail effectué au Laboratoire
de Chimie organique et de Contrôle physicochimique des médicaments
(Professeur P. MESNARD)

U.E.R. des Sciences pharmaceutiques

Université de Bordeaux II

-:-

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 5

ANTIARIS *africana* Engl. (Moracées)
Etude comparative avec l'Antiaris toxicaria Lesh. 9

- *GENERALITES* 11

I - Les Moracées : le genre Antiaris 11
II - Enquêtes ethnobotaniques sur l'Antiaris africana au Sénégal 13
A/ Habitat
B/ Usages
III - Matériel d'étude 13
IV - Plan d'étude 14

- *PREMIERE PARTIE : ETUDE BOTANIQUE* 15

I - Description 15
II - Travaux personnels. Etude morphologique et anatomique 16

- *DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS*
RAPPEL DE LA CONSTITUTION DE L'ANTIARIS toxicaria LESH. 19

- *TROISIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS*
ETUDE CHIMIQUE DE L'ANTIARIS africana ENGL. 27

Chapitre I : Rappels sur les réactifs généraux des digitaliques utilisés au cours du travail 28

Chapitre II : Essais préliminaires 33
A/ Recherche des Alcaloïdes 33
B/ Recherche des Hétérosides digitaliques 34

Chapitre III : Extraction et purification des Hétérosides digitaliques totaux du suc 36

Pages

Chapitre IV : Etude chromatographique. Identification 41

Chapitre V : Isolement des principaux constituants par chromatographie sur colonne 46

Chapitre VI : Propriétés physico-chimiques des Hétérosides isolés. 57

COMBRETUM glutinosum Perr (Combrétacées)

Etude comparative avec le Combretum micranthum G.Don 83

- *G E N E R A L I T E S* 85

I - Les Combrétacées : le genre Combretum 85

II - Enquêtes ethnobotaniques, sur le Combretum glutinosum au Sénégal 87

A/ Habitat

B/ Usages

III - Matériel d'étude 90

IV - Plan d'étude 91

- *PREMIERE PARTIE : ETUDE BOTANIQUE* 93

I - Rappel des travaux antérieurs 93

II - Travaux personnels 94

- Description 94

- Etude morphologique et anatomique 95

- *DEUXIEME PARTIE : RAPPEL DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DU C.MICRANTHUM* 99

- *TROISIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS*

ETUDE CHIMIQUE COMPARATIVE DU COMBRETUM GLUTINOSUM ET DU COMBRETUM MICRANGHUM 101

Chapitre I : Essais préliminaires 102

A/ Recherche des composés polyphénoliques 103

1. Acides phénols et autres acides organiques 106

2. Tanins 103

3. Proanthocyanidols - Catéchols 105

4. Dérivés flavoniques 106

B/ Recherche des Alcaloïdes 109

C/ Recherche des Dérivés quinoniques 109

D/ Recherche des Saponosides 109

Pages

E/ Recherche des Hétérosides cyanogénétiques 109

F/ Recherche des Stérols 110

Chapitre II : Etude particulière des Proanthocyanidols 111

Chapitre III : Etude particulière des Flavonoïdes 123

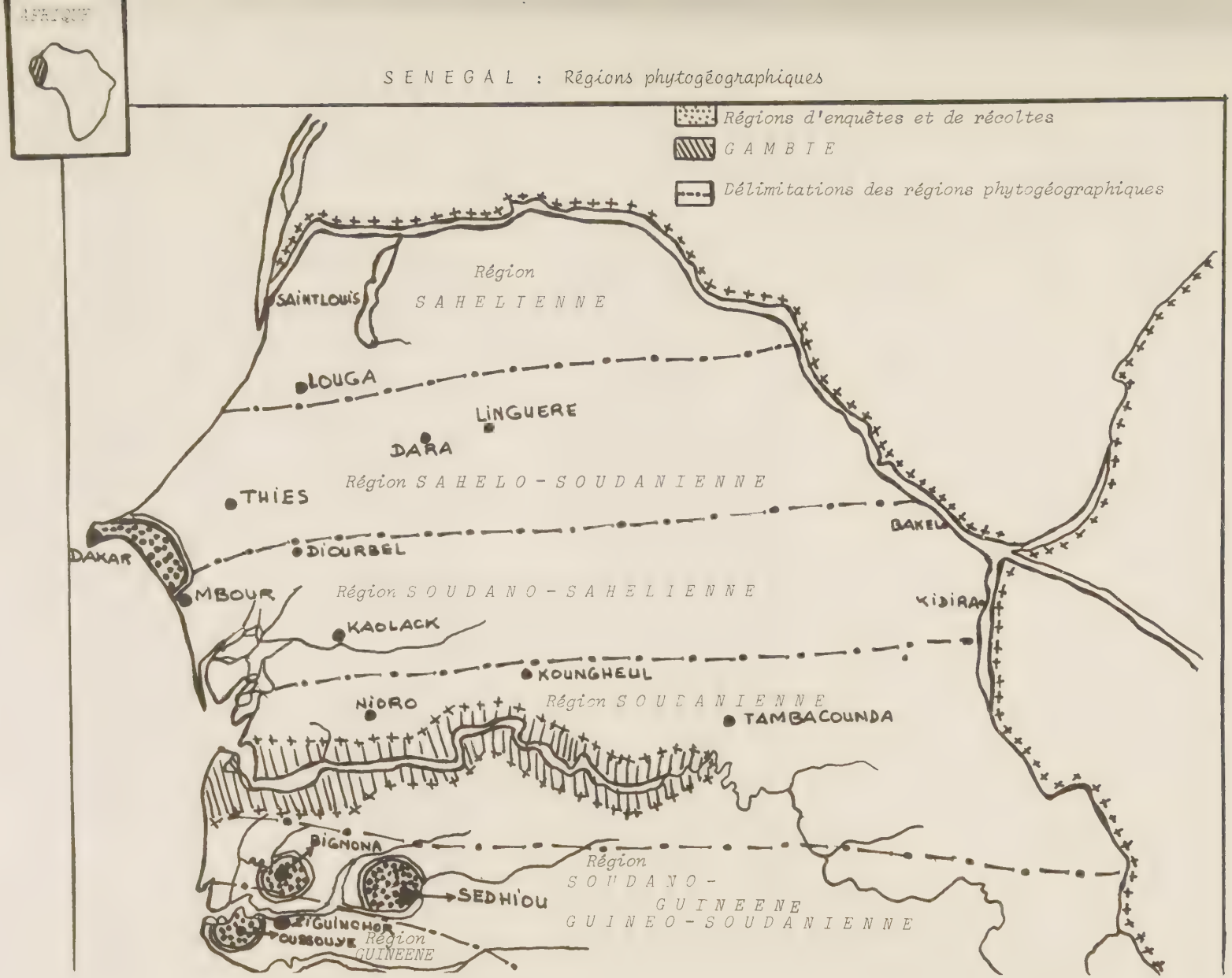
A/ Extraction et purification 123

B/ Etude chromatographique 125

C/ Isolement 127

D/ Propriétés physico-chimiques des Constituants isolés 128

C O N C L U S I O N S 145


AFRIQUE
SENEGAL : Régions phytogéographiques
Régions d'enquêtes et de récoltes
GAMBIE
Délimitations des régions phytogéographiques
Région SAHELTENNE
SAINTLOUIS
LOUGA
LINGUERE
DARA
Région SAHELO-SOUDANIENNE
THIES
DAKAR
DIOURBEL
BAKEL
MBOUR
Région SOUDANO-SAHELIENNE
KIDIRA
KAOLACK
KOUNGHEUL
NIORO
Région SOUDANIENNE
TAMBACOUNDA
BIGNONA
Région SOUDANO-GUINEENE GUINEO-SOUDANIENNE
SEDHIOU
ZIGUINCHOR
OUSSOUYE
Région GUINEENE

I N T R O D U C T I O N

Située dans la zone tropicale ouest-africaine, la République du Sénégal s'étend sur une superficie de 200 000 km^2, entre 12°18' et 16°41' de latitude Nord, 10°21' et 17°32' de longitude Ouest.

Elle est limitée à l'ouest par l'Océan Atlantique, au nord-est par le fleuve Sénégal et son affluent la Falémé, au sud par la Guinée (Bissau) et la Guinée (Conakry).

On peut schématiquement y distinguer 3 régions phytogéographiques du nord-est au sud-ouest (91).

1 - La région Sahélienne :

Elle est dominée par un paysage de prairies à pâturages, consacrées essentiellement à l'élevage. Elle comporte surtout des herbes annuelles ne dépassant pas 1 mètre et quelques arbustes clairsemés. On peut y remarquer une végétation particulière dans les zones de la vallée d'inondation du fleuve Sénégal. La pluviosité est en moyenne de 300 mm par an, répartie sur deux mois.

2 - La région Soudanienne :

C'est la région des savanes où la pluviosité atteint 700 à 900 mm.

Elle comporte encore des herbes annuelles, mais les arbres y sont plus denses et plus grands. On y rencontre même de belles forêts au Centre et vers l'est avec des arbres à feuilles caduques.

3 - La région Guinéenne :

Elle correspond à la région méridionale du pays (Casamance).

Les sols y conservent une humidité permanente avec une pluviosité atteignant 1800 mm répartie sur 4 mois de l'année (juin à octobre).

On y rencontre encore quelques vestiges de forêts denses malgré l'extension des cultures et des feux de brousse.

Cette description sommaire des zones phytogéographiques laisse entrevoir l'abondance et la diversité de la flore sénégalaise dont beaucoup de représentants sont utilisés en médecine indigène traditionnelle, offrant ainsi au phytochimiste un terrain propice aux recherches.

Malgré les progrès fulgurants de la synthèse chimique, l'étude des substances naturelles végétales demeure toujours actuelle et digne d'intérêt. En Afrique, 60 à 80 % des populations se soignent encore par des préparations empiriques réalisées à partir de plantes locales. Ce taux montre à l'évidence tout l'intérêt que doit susciter leur étude. Il est heureux de constater qu'un grand mouvement se dessine dans ce sens depuis le Symposium sur les *"Pharmacopées traditionnelles et les plantes médicinales africaines"*, qui s'est tenu à Dakar en 1968 sous l'égide du Conseil Scientifique de l'O.U.A. (Organisation de l'Unité Africaine). Trois groupes d'orientation peuvent être définis pour ces recherches (42) :

1) Réalité et connaissance des thérapeutiques traditionnelles africaines par des enquêtes ethnobotaniques sur le terrain, au contact des guérisseurs de métier dont il faut déplorer la disparition progressive : nous faisons écho au cri d'alarme de A. HAMPATE BA "En Afrique, chaque fois qu'un vieillard s'éteint, c'est un livre qui brûle".

2) Etudes systématiques au laboratoire sur le plan botanique, chimique, pharmacologique, afin d'établir une sélection parmi les informations recueillies. Ces études doivent se faire parallèlement à la constitution de droguiers et au développement de jardins botaniques expérimentaux.

3) Etude des possibilités en matières premières pharmaceutiques pour leur exploitation industrielle éventuelle. A ce point de vue on connait déjà de grands apports de la flore africaine à la thérapeutique moderne, tels ces médicaments majeurs Strophantus et Rauwolfia pour ne citer que ces deux exemples.

La collaboration de plusieurs disciplines (agronomes, forestiers, ethnobotanistes, sociologues, chimistes, médecins, pharmacologues, etc...) est donc souhaitable pour la connaissance des thérapeutiques traditionnelles africaines.

Les recherches devraient tenir compte du caractère très particulier de cette "Médecine", qui associe des connaissances et des techniques réelles fondées sur l'observation et transmises oralement de générations en générations, à tout un environnement culturel ésotérique et magico-mystique non moins réel, variable selon les ethnies et leurs croyances.

Un certain nombre d'articles et de traités scientifiques existent déjà (2 - 3 - 9 - 14 - 15 - 19 - 35 - 36 - 71 - 91 - 92 - 99). Ils constituent des bases très appréciables pour des études plus exhaustives.

Au Sénégal, la plupart des plantes médicinales ont été inventoriées grâce aux efforts méritoires de certains chercheurs (42 - 43 - 44 - 45).

Avec le développement de l'infrastructure existante, aucun obstacle ne devrait s'élever pour la poursuite des études chimiques et pharmacologiques, beaucoup moins avancées que les recherches ethnobotaniques systématiques.

Le Service de chimie organique et de Contrôle physico-chimique des médicaments de l'Université de Bordeaux II se préoccupe depuis longtemps des problèmes posés par les hétérosides cardiotoniques et leurs sources végétales (20 - 49 - 59 - 60 - 61 - 62 - 63). C'est donc bien volontiers que nous y avons entrepris ce travail de chimie végétale, suggéré par Monsieur le Professeur MESNARD (*) et encouragé par Monsieur le Doyen MASQUELIER (*).

Nous avons également bénéficié des conseils très précieux des chercheurs de "l'Institut de chimie des substances naturelles de Gif-sur-Yvette - CNRS" dirigé par Monsieur le Professeur JANOT, et en particulier Monsieur POTIER et Monsieur HUSSON (*).

Les études botaniques ont été effectuées sous la direction de Monsieur le Professeur LEMESLE et de Mademoiselle le Professeur ROUSSEAU, de la Faculté de Médecine de Poitiers (*).

Des enquêtes ethnobotaniques complétées par des récoltes sur le terrain, nous ont permis de rassembler un certain nombre de plantes utilisées couramment en médecine populaire sénégalaise. Après des essais préliminaires de "screening" chimique, notre choix s'est porté essentiellement sur deux espèces :

(*) Qu'ils veuillent bien trouver dans ce travail un hommage respectueux et l'expression de notre profonde reconnaissance.

1 - *L'Antiaris africana Engl.* (Moracées) étudié comparativement à l'Antiaris toxicaria Lesh, asiatique.

Son intérêt repose sur ses principes cardiotoniques.

2 - *Le Combretum glutinosum Perr* (Combrétacées) étudié comparativement au Combretum micranthum G.Don officinal.

Son intérêt repose sur sa constitution polyphénolique en rapport avec ses nombreux usages médicinaux.

A N T I A R I S *africana* Engl.

Etude comparative avec l'Antiaris toxicaria Lesh. (Moracées)

G E N E R A L I T E S

I - LES MORACEES : LE GENRE ANTIARIS

Les Antiaris appartiennent à la famille des Moracées (Artocarpées), famille essentiellement tropicale d'Asie et d'Afrique, classée parmi les Angiospermes - Dicotylédones - Apétales (77), et dont on rencontre sept genres au Sénégal (42) :

1 - Antiaris,
2 - Chlorophora,
3 - Myrianthus,
4 - Treculia,
5 - Ficus,
6 - Artocarpus,
7 - Dorstenia.

Ce sont des arbres ou des arbustes à latex (latécifères vrais). Les feuilles isolées sont alternées ou rarement opposées, simples, parfois lobées surtout chez les formes du jeune âge, stipulées par paires.

Les fleurs sont réduites, unisexuées, généralement situées à l'intérieur d'un réceptacle accrescent.

Le fruit est un akène ou une drupe.

Les Moracées fournissent surtout des espèces d'intérêt alimentaire par leurs fruits riches en sucres (figuier : Ficus carica L., arbre à pain : Artocarpus incisa L.).

Le genre Antiaris comporte différentes variétés asiatiques et africaines. On les rencontre depuis l'Afrique de l'Ouest jusqu'à Zanzibar, à Madagascar, en Asie du Sud-Est, en Indonésie, jusqu'aux îles Fiji.

CLASSIFICATION DES ANTIARIS

Les opinions divergent quant à leur classification spécifique.

- Certains auteurs groupent toutes les variétés asiatiques et africaines dans une seule et même espèce : l'Antiaris toxicaria.

- D'autres distinguent quatre espèces :

1) Antiaris toxicaria : Inde, Australie et Nouvelle Calédonie.
2) Antiaris africana.
3) Antiaris welwitschii.
4) Antiaris usambarensis.

Ces trois dernières espèces étant réparties en Afrique.

- Enfin une troisième classification due à CORNER (16), ne retient que deux grandes espèces :

1 - *Antiaris toxicaria Lesh.* :

que l'on trouve surtout en Asie du Sud-Est et en Malaisie, mais dont certaines variétés se rencontrent disséminées sur le Continent Africain. CORNER en distingue trois variétés qui diffèrent surtout par la taille du fruit :

a) A. welwitschii ou A. usambarensis en Afrique tropicale.

b) A. toxicaria (sensu stricto) en Asie du Sud-Est et en Indonésie.

c) A. macrophylla ou A. benetii, aux îles Molluques, Fiji, Philippines.

2 - *Antiaris africana Engl.* :

synonymies { - Antiaris kerstingii Engl.,
- Antiaris toxicaria (Rumph., ex. Pers) var. africana (Sc. Elliot),

que l'on trouve répandu en Afrique Centrale et Occidentale.

C'est cette dernière classification la plus communément admise, que nous retiendrons.

II - ENQUETES ETHNOBOTANIQUES SUR L'ANTIARIS AFRICANA AU SENEGAL HABITAT ET USAGES

Noms vernaculaires :

- Mandingue : Tumbouyiri-koyo (ne pas confondre avec Tumbuyiri-fing (Morus mesogya).
- Diola : boufor ou boufok.
- Wolof : kän.

L'Antiaris africana se rencontre surtout en Casamance maritime, rarement dans les forêts soudaniennes et dans les sols frais du Sine - Saloum et du Sénégal Oriental.

On le trouve également en peuplements clairsemés sur les plateaux de la région de Thiès et dans les petites vallées environnantes.

Il est relativement peu utilisé en thérapeutique traditionnelle sénégalaise.

On nous a seulement signalé l'action purgative des écorces et des racines. KERHARO (42) rapporte la mise à profit de cette action dans le traitement de la lèpre notamment.

Par ailleurs l'écorce fibreuse a servi a certaines époques à la confection des vêtements.

En tout cas l'A. africana n'est pas considéré comme toxique dans la région où nous avons mené nos enquêtes (Moyenne et Basse Casamance). En particulier, les informations recueillies ne nous ont pas permis d'établir l'utilisation du suc d'A. africana dans les préparations de poisons de flèche ou poisons d'épreuve.

Or, nous savons que l'Antiaris toxicaria fut très largement utilisé en Asie (Indonésie, Malaisie) comme ingrédient principal du poison sagittaire connu sous le nom de "UPAS ANTIAR" ou "IPOE" (78).

Au cours de nos récoltes nous avons toutefois constaté l'action irritante du latex projeté sur la peau et son amertume très prononcée.

III - MATERIEL D'ETUDE

Nous avons récolté des échantillons de feuilles, d'écorces, et de latex en Moyenne et Basse Casamance dans les galeries forestières de Sédhiou et de Tendième, en des lieux différents et également en des périodes différentes de l'année.

Les identifications ont été faites avec l'aide des services forestiers locaux et du département de botanique de l'IFAN (Institut Fondamental d'Afrique Noire).

Nos études ont porté essentiellement sur quatre sortes d'échantillons (Tableau I). Les trois premiers proviennent du même arbre, mais ont été récoltés en des périodes différentes de l'année, tandis que le quatrième provient d'un autre arbre, ce qui nous a permis d'étudier la variation de la composition d'A. africana en fonction de la période et du lieu de récolte.

Echantillons	*Lieu de récolte*	*Période de récolte*
n°1	Environs de SEDHIOU sur un terrain siliceux.	Juin-Juillet 1971
n°2	- id -	Décembre 1971 et Janvier 1972
n°3	- id -	Mars - Avril 1972
n°4	Terrains marécageux en bordure des rizières de SEFA.	Mars - Avril 1972

T A B L E A U I

IV - PLAN D'ETUDE

Contrairement à l'Antiaris toxicaria auquel de nombreux travaux ont été consacrés, l'Antiaris africana est beaucoup moins connu.

Nous nous sommes proposé d'en préciser l'étude :

- Dans une première partie consacrée à l'étude botanique, nous rapporterons nos recherches sur la morphologie et l'anatomie de la tige et des feuilles.
- Avant d'entreprendre l'étude chimique de l'Antiaris africana, nous ferons le point sur les travaux antérieurs consacrés presque exclusivement à l'Antiaris toxicaria dont la composition chimique sera rappelée dans la deuxième partie.
- Dans la troisième partie, nous exposerons nos résultats sur la composition chimique de l'Antiaris africana et plus particulièrement de son latex.

Première Partie

E T U D E B O T A N I Q U E

I - DESCRIPTION

L'Antiaris africana se présente sous forme d'un grand arbre pouvant atteindre 30 à 35 mètres, au fût droit, cylindrique, à écorce grise finement fissurée laissant exsuder par incision un latex clair qui brunit en vieillissant. Les feuilles sont alternes, largement ovales, à base asymétrique arrondie ou coudée, à sommet obtus, ou courtement acuminé, mesurant environ 12 cm de long sur 8 cm de large pour les échantillons étudiés. Elles sont scabres sur les deux faces, avec une nervation réticulée sur la face inférieure ; le bord du limbe est irrégulièrement et finement denté.

L'Antiaris africana est monoïque ou dioïque :

- les fleurs mâles de couleur verdâtre, sont portées par des réceptacles aplatis de 12 mm de diamètre environ, axillaires à l'extrémité de pédoncules courts ;
- les fleurs femelles sont solitaires, sans périanthe.

Le fruit est une drupe ovoïde, tomenteuse, grisâtre de 1 à 1,5 cm de long.

II - ETUDE MORPHOLOGIQUE ET ANATOMIQUE (18)

A - STRUCTURE ANATOMIQUE DE LA TIGE (fig. 1)

L'examen des coupes histologiques de la tige montre :

1) *Une partie corticale* relativement bien développée et hétérogène où l'on distingue :

a) *Le liège.*

b) *Trois couches de cellules :*

- une première couche de cellules ovoïdes ;
- une deuxième couche de cellules aplaties plus petites ;
- une troisième couche de grands éléments rappelant ceux de la première couche.

Cette structure épidermique pluristrate se retrouve d'ailleurs chez toutes les Moracées.

2) *Un cylindre central* en pachyte continu comportant :

a) *Un liber secondaire* très abondant.

b) *Un bois secondaire* disposé régulièrement en files radiales, avec des éléments vasculaires de section carrée et une zone sclérenchymateuse formée d'éléments de petit calibre.

c) *Un bois primaire* constitué de larges vaisseaux.

d) *Une moelle homogène*, cellulosique, mais lignifiée dans les échantillons âgés.

3) *Un appareil sécréteur* constitué par :

a) *Des cellules sécrétrices* à contenu complexe dans le liège et résineux dans la moelle et la zone corticale.

b) *Des latérifères vrais*, parmi lesquels quelques-uns sont disséminés dans la zone corticale tandis que de nombreux autres sont localisés dans le liber et dans la zone circum médullaire, dont le latex est très riche en substances résineuses.

B - STRUCTURE ANATOMIQUE DE LA FEUILLE (fig. 2)

Elle comporte :

1) La nervure centrale :

avec un arc libéro-ligneux continu à la face inférieure, coiffé de deux à trois faisceaux à la face supérieure et une moelle sclérifiée contenant de nombreux amas de liber.

2) Le limbe :

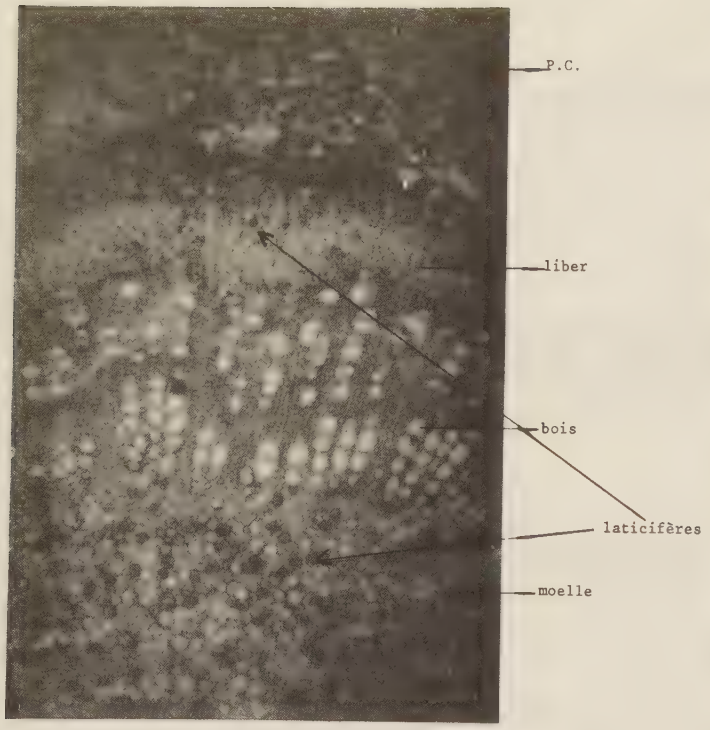
de type isolatéral (parenchyme palissadique sur les deux faces), où l'on distingue également un hypoderme hétérogène.

3) Des poils tecteurs :

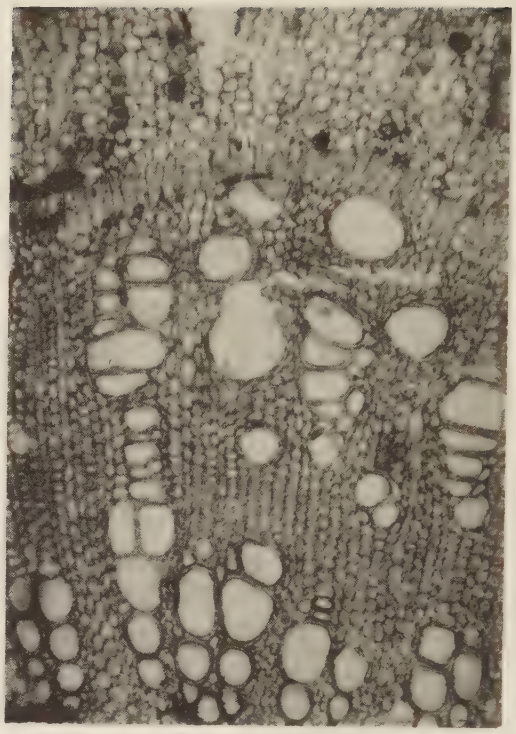
sclérifiés, peu abondants, à la face inférieure.

4) Un appareil sécréteur :

identique à celui de la tige.



VUE GENERALE



GROSSISSEMENT DU LIBER ET DU BOIS

Fig. 1 - Tige d'*Antiaris africana Engl.*

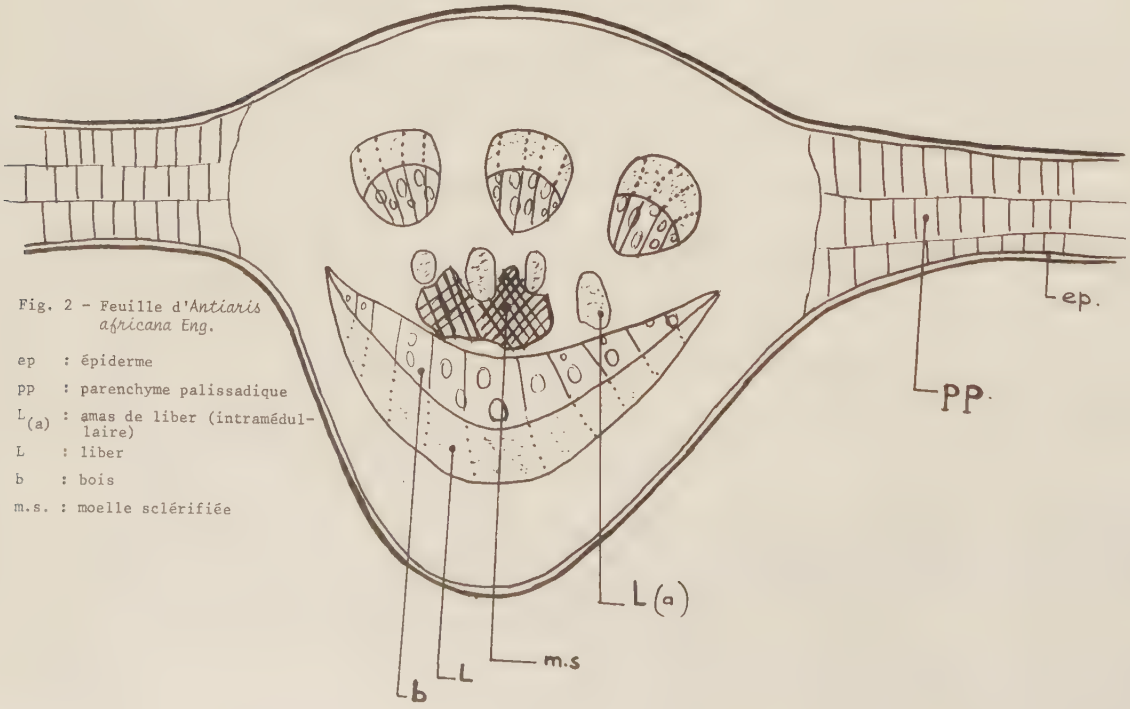


Fig. 2 - Feuille d'*Antiaris africana Eng.*

ep : épiderme

pp : parenchyme palissadique

$L_{(a)}$: amas de liber (intramédullaire)

L : liber

b : bois

m.s. : moelle sclérifiée

Deuxième Partie

TRAVAUX ANTERIEURS

RAPPEL DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE L'ANTIARIS TOXICARIA LESH.

Nous distinguerons le suc, les graines et les autres organes de la plante.

I - LE SUC

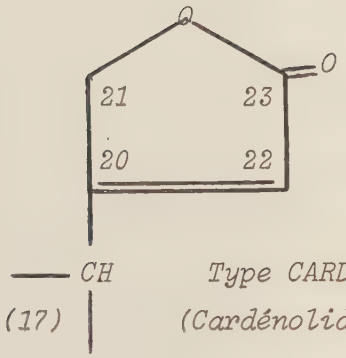
Le latex d'Antiaris toxicara Lesh d'Asie du Sud-Est et d'Indonésie, dont nous avons signalé l'utilisation très courante comme poison de flèche "UPAS ANTIAR", par les populations de ces régions, est très riche en hétérosides digitaliques.

Les premières observations sont dues à PELLETIER et CAVENTON en 1838 (76), suivies de celles de KILIANI (46) ; elles permirent à MULDER (69) d'isoler une substance active qu'il dénomma "antiarine", et dont, quelques années plus tard, DE VRY et LUDWIG (21) montrèrent la nature hétérosidique ; KILIANI (47) observa qu'elle existe en réalité sous deux formes : α-antiarine et β-antiarine.

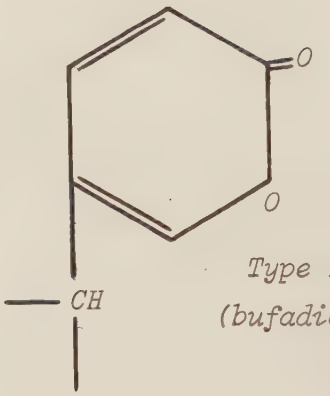
Il est désormais bien établi que les deux antiarines, constituants majeurs du suc, appartiennent, comme les autres composants qui les accompagnent, au groupe des hétérosides digitaliques cardénolides.

Elles comportent donc une génine de structure stéroïdique, à 23 atomes de carbone avec un cycle pentano-perhydro-phénanthrénique et une chaîne latérale du type buténolide (cycle pentagonal lactonique à une double liaison).

T A B L E A U II

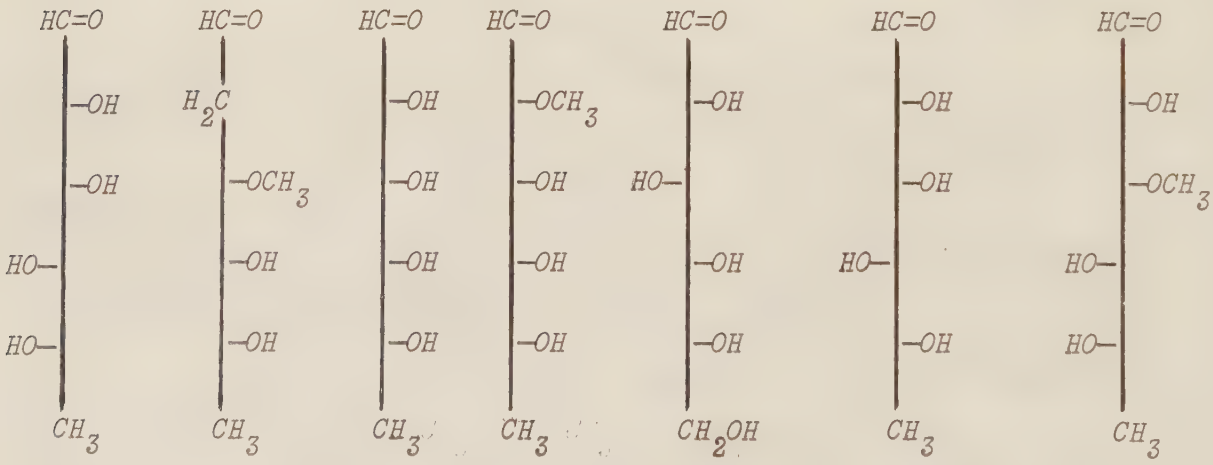


Type CARDA
(Cardénolides)



Type BUFA
(bufadiénolides)

CYCLES LACTONIQUES INSATURES DES DIGITALIQUES



L.rhamnose D.cymarose D.allose D.javose D.glucose D.gulométhylose L.acofriose

SUCRES DES HETEROSIDES DE L'A.TOXICARIA

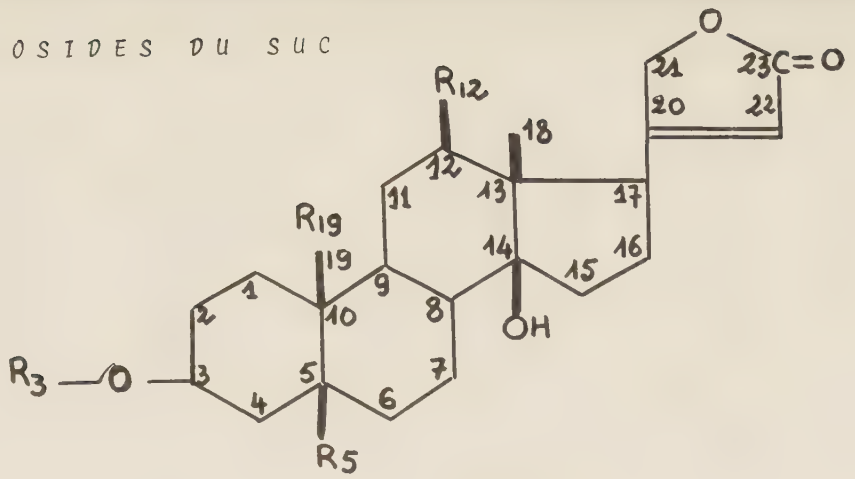


TABLEAU III

HETEROSIDES A GENINES SPECIFIQUES DES ANTIARIS

GENINES Hétérosides correspondants	R3	R_{19}	R_{12}	R_5
ANTIARIGENINE	H	-CH=O	-OH	-OH
1 – α-Antiarine	Desoxy-gulose	"	"	"
2 – β-Antiarine	L-Rham-nose	"	"	"
3 – Substance K de Juslen	Laco-friose	"	"	"
ANTIOGENINE	H	$-CH_3$	-OH	-OH
1 – Antioside	Desoxy-gulose	"	"	"
2 – α-Antioside	L.Rham-nose	"	"	"

TABLEAU IV

HETEROSIDES A GENINES NON SPECIFIQUES DES ANTIARIS

GENINES Hétérosides correspondants	R_3	R_{19}	R_{12}	R_5
STROPHANTIDINE	H	CH=O	H	OH
1 – Convallatoxine	L.Rham-nose	"	"	"
2 – Desglucocheirotoxine	Desoxy-gulose	"	"	"
STROPHANTIDOL	H	CH_2 OH	H	OH
1 – Convallatoxol	L.Rham-nose		"	"
DIGITOXIGENINE	H	CH_3	H	H
1 – Evomonoside	L.Rham-nose	"	"	"
DIGOXIGENINE	H	CH_3	OH	H
1 – Substance E de Wehrli ou γ de Juslen	L.Rham-nose	"	"	"
CANNOGENINE	H	CH=O	H	H
1 – Malayoside	L.Rham-nose	"	"	"
PERIPLOGENINE	H	CH_3	H	OH
1 – β-D glucopériplogénine	D.glu-cose	"	"	"
2 – Substance γ' de Juslen	L.Rham-nose	"	"	"

Pour les bufadiénolides ou scilladiénolides à 24 atomes de carbones, la chaîne latérale lactonique est hexagonale et possède deux doubles liaisons.

Les génines des cardénolides se caractérisent également par leur fonction 14-β-hydroxyle, en position Cis par rapport au méthyl en 18 ; elles appartiennent pour la plupart à la série 5-β et possèdent un hydroxyle en 3, siège de la liaison osidique.

Le sucre peut être du glucose ou du rhamnose, mais le plus souvent il s'agit de sucres inhabituels à l'état naturel, les désoxy-6 hexoses et les désoxy-2,6 hexoses, souvent méthylés.

Tous les glucosides cardiotoniques naturels connus sont, en ce qui concerne la liaison entre le sucre et la génine, des β-glucosides, si le sucre est de la série D, et des α-glucosides, si le sucre est de la série L.

A ce sujet on peut remarquer que l'α-antiarine est en réalité un β-glucoside (sucre = D-désoxygulose), et la β-antiarine, un α-glucoside (sucre = L Rhamnose). Une fois la structure des antiarines établie, les recherches se multiplièrent sur le suc de l'Antiaris toxicaria et aboutirent à la mise en évidence d'une trentaine d'hétérosides digitaliques, notamment celles de BISSET (10) et surtout celles de l'école Suisse de Reichstein avec : DOEBEL (22), DOLDER (23), MARTIN et TAMM (56), JUSLEN (38), WEHRLI (102), SHINDLER (94), BRANDT (12), TSCHESCHE et HAUPT (100).

Nous avons regroupé dans les tableaux III et IV les structures, schématisées à partir du squelette cardénolide, des principaux hétérosides du suc mentionnés dans la littérature.

Certains sont spécifiques des Antiaris (α-antiarine, β-antiarine et antioside) tandis que la plupart se rencontrent dans d'autres espèces végétales (Strophantus, digitale, muguet, etc...).

Nous notons en particulier que :

1) L'α-antiarine et la β-antiarine possèdent la même génine, l'antiarigénine. Elles ne diffèrent que par leur sucre :

   - L-rhamnose pour la β-antiarine ;
   - D-désoxygulo-méthylose (antiarose) pour l'α-antiarine.

2) L'antiogénine de l'antioside se distingue de l'antiarigénine par un substituant méthyl en 19 au lieu d'un groupement aldéhydique.

3) La Strophantidine ne diffère de l'antiarigénine que par l'absence de l'hydroxyle en 12, dont la position resta longtemps indéterminée et qui caractérise l'antiarigénine et l'antiogénine dans le groupe des cardénolides actuellement connus.

II - LES GRAINES

Comme l'ont montré BISSET (10) et MULRADT (70), elles sont également très riches en hétérosides cardiotoniques. Mais alors que pour le premier, leur composition est à peu près identique à celle du suc, le second signale des différences notables. Elles contiennent de nombreux cardénolides non décelés dans le latex : antialloside, antiarojavoside, antiogoside, cymarine, cymarol, péripalloside, périplorhamnoside.

Ainsi qu'on peut le constater (tableau V), la différence se situe surtout au niveau de la fraction sucrée. On trouve en effet trois nouveaux sucres : le D-cymarose, le désoxy-6 allose et le D-javose. En revanche trois sucres des hétérosides du latex sont absents de ceux des graines : le désoxygulose, le ℓ-acofriose et le D-glucose.

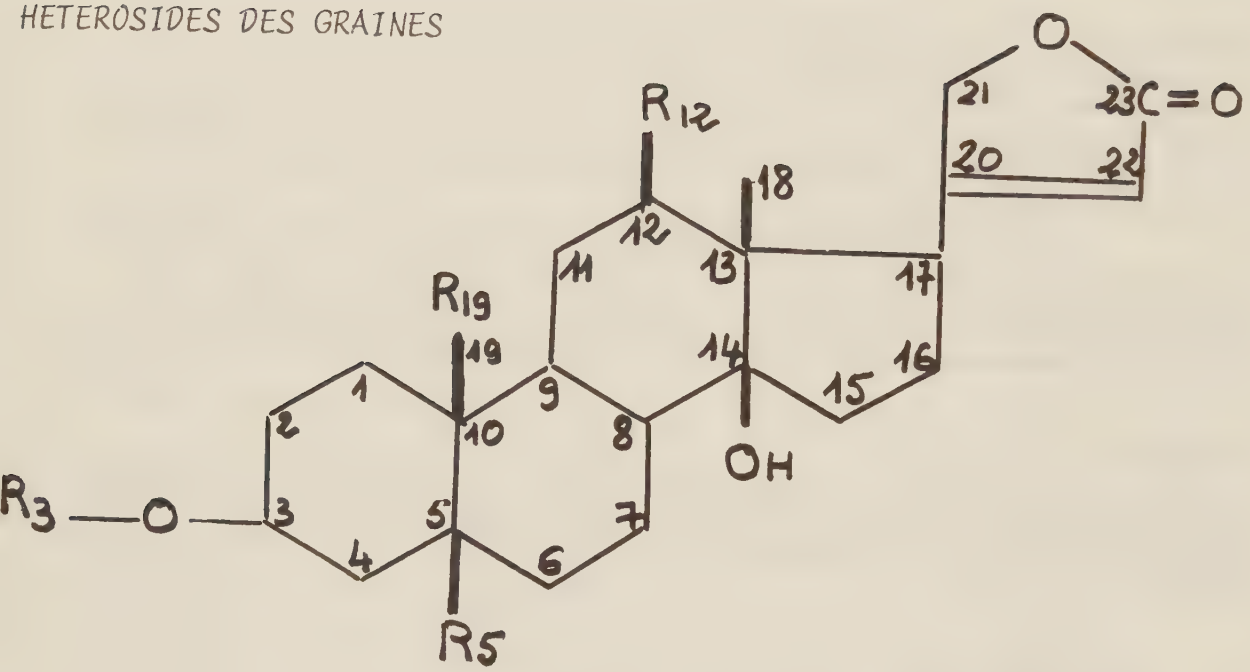
Seul le ℓ-rhamnose est commun aux hétérosides du suc et des semences.

Certaines différences peuvent également être observées en ce qui concerne les génines : la digitoxigénine, la digoxigénine et la cannogénine sont absents des graines.

III - LES AUTRES ORGANES : FEUILLES, ECORCES ET BOIS

BISSET a mis en évidence dans l'écorce et le bois, l'α-antiarine, la β-antiarine et l'antioside, mais en proportion beaucoup moindre que dans le suc et les graines. Par contre il n'a pas décelé d'hétérosides dans les feuilles, les fleurs et la pulpe des fruits.

Ce rappel succinct des travaux antérieurs sur l'Antiaris toxicaria montre les rapports étroits qui existent entre sa composition et celle des autres plantes digitaliques dont on connaît environ 150 espèces réparties dans une cinquantaine de genres qui appartiennent à 12 familles végétales : (Apocynacées, Asclépiadacées, Crucifères, Renonculacées, Liliacées, Célastracées, Scrofulariacées, Légumineuses, Moracées, Tiliacées, Sterculiacées, Euphorbiacées) (25). A ce sujet, il convient d'ailleurs de noter qu'il n'existe aucun parallélisme entre cette répartition des digitaliques chez les végétaux et les classifications naturelles (phylogénétiques) des plantes, sauf le fait qu'elles sont toutes des angiospermes. Il est vrai cependant que certains genres sont particulièrement favorables à la présence de digitaliques ; c'est ainsi qu'on en a trouvés dans une trentaine d'espèces de Strophantus. Par ailleurs si beaucoup d'espèces des familles signalées ne contiennent pas d'hétérosides digitaliques, on y trouve souvent des substances à



GENINES & Hétérosides correspondants	R_3	R_{19}	R_{12}	R_5
ANTIARIGENINE	H	-CH=O	-OH	-OH
1 - Antialloside	6-Desoxyallose	"	"	"
2 - Antiarojavoside	D-javose	"	"	"
ANTIOGENINE	H	$-CH_3$	-OH	-OH
1 - Antiogoside	6-Desoxyallose	"	"	"
STROPHANTIDINE	H	-CH=O	-H	-OH
1 - Cymarine	D-cymarose	"	"	"
STROPHANTIDOL	H	$-CH_2OH$	-H	-OH
1 - Cymarol	D-cymarose	"	"	"
PERIPLOGENINE	H	$-CH_3$	-H	-OH
1 - Péripalloside	Desoxyallose	"	"	"
2 - Périplorhamnoside	L.Rhamnose	"	"	"

TABLEAU V

squelette stéroïde (alcaloïdes ou Saponines stéroliques), ce qui laisserait supposer que tous ces corps, lors de leur biogenèse, sont formés à partir d'un intermédiaire commun. Des travaux récents (82, 83) tendent à montrer que pour les génines digitaliques, les intermédiaires possibles sont l'acide mévalonique, puis le squalène, mais non le cholestérol.

En ce qui concerne l'Antiaris toxicaria nous constatons que tous les hétérosides signalés sont des monosides.

Plusieurs auteurs ont remarqué que la composition du suc est variable selon l'origine botanique de l'échantillon étudié. En particulier il est exceptionnel de trouver dans le même échantillon l'α-antiarine et la β-antiarine. Ce fait serait-il imputable aux techniques d'analyse ou correspond-il à la réalité ? Dans le même ordre d'idées, il faut signaler que REICHSTEIN (85) a abouti à des constatations analogues chez diverses Apocynacées difficiles à distinguer morphologiquement, mais dont l'analyse chimique conduit à des résultats fort différents. De même FRERE JACQUE (25) a obtenu un digitalique puissant, la hongheline, à partir d'un échantillon d'Adenium honghel récolté près de Saint-Louis du Sénégal, alors que REICHSTEIN (86) à partir d'un échantillon de la même plante récoltée au Nigéria, a isolé des digitaliques dont la génine est l'oléandrogénine.

Ces diverses observations constituent pour nous une hypothèse de travail que nous allons appliquer à l'étude de l'Antiaris africana.

Troisième Partie

ETUDE CHIMIQUE DE L'ANTIARIS AFRICANA ENGL.

TRAVAUX PERSONNELS

Comme nous l'avons déjà signalé, nous disposons de peu de renseignements sur l'Antiaris africana. BISSET (10) a étudié un certain nombre d'échantillons en provenance du Congo, de l'Ouganda, du Ghana, du Nigéria et de la Sierra Leone.

Dans les extraits bruts de graines et de latex il a identifié des composés similaires à ceux de l'Antiaris toxicaria, notamment l'α-antiarine et la β-antiarine mais en plus faible quantité. Dans une étude préliminaire sur un échantillon du Kenya, WEHRLI (102) aboutit à des conclusions un peu différentes ; il signale seulement la présence d'évomonoside et de malayoside avec quelques autres substances non identifiées à l'exclusion de l'α-antiarine et de la β-antiarine.

- Ces travaux sur l'Antiaris africana n'ont pas été poursuivis probablement par insuffisance de matériel d'étude.

C'est cette lacune que nous avons essayé de pallier.

- Après un bref rappel sur les réactifs généraux des hétérosides digitaliques auxquels nous avons fait appel, nous décrirons ensuite :

1) Les essais préliminaires effectués sur les feuilles, les écorces et le suc.

2) Les modes d'extraction et de purification des hétérosides totaux du suc.

3) Leur identification par chromatographie et l'isolement des principaux d'entre eux.

- Nous préciserons ensuite leur identité chimique d'après les propriétés physico-chimiques.

-:-

Chapitre I

RAPPEL SUR LES REACTIFS GENERAUX DES HETEROSIDES DIGITALIQUES

Les tableaux VI et VII rassemblent les réactifs de coloration et de fluorescence utilisés au cours de ce travail (1 - 49).

Ils nous ont permis de suivre l'isolement et la purification des composés et ont servi à la révélation des chromatogrammes.

Les réactions sont liées aux caractéristiques chimiques des glucosides digitaliques, soit au niveau de la génine, soit au niveau du sucre.

Selon FRERE JACQUE (26) elles peuvent être classées en deux groupes :

1 - Réactions en milieu alcalin :

La plupart d'entre elles mettent en jeu des dérivés nitrés aromatiques. Elles sont dues aux aglycones et liées à la présence de la double liaison sur la chaîne lactonique ; elles deviennent négatives si celle-ci disparaît par hydrogénation ou par isomérisation.

Les colorations obtenues, pratiquement indépendantes du glucoside testé, sont particulièrement utiles pour la révélation des chromatogrammes.

2 - Réactions en milieu acide :

Elles sont réalisées en présence d'un acide fort. Elles résultent généralement d'un processus complexe comportant soit la libération de produits d'altération des oses qui se combinent à un second constituant du réactif (xanthydrol, aldéhyde ou oxydant), soit une réaction d'hydrolyse, avec déshydratation, créant des doubles liaisons responsables de l'apparition de fluorescences caractéristiques.

Les colorations obtenues sont très variées et se modifient souvent avec le temps.

Elles permettent de différencier deux digitaliques purs plus facilement que les réactifs du premier groupe ; mais elles sont moins spécifiques du groupe des digitaliques et d'un emploi moins commode.

- Ces deux groupes de réactions ont été systématiquement appliquées aux divers extraits à étudier en solution, ou utilisées pour révéler les spots sur les chromatogrammes.

C'est la réaction de Kedde que nous avons finalement retenue à cause de sa sensibilité et la stabilité relative des colorations obtenues.

(Voir tableaux VI et VII pages suivantes).

TABLEAU VI - Réactions en milieu alcalin.

Réactions	*Réactifs*	*Technique*	*Colorations*
Réaction de Legal au Nitroprussiate de sodium	I — Nitroprussiate de sodium 0,5 g ; Eau ..... 100 ml II — Na OH/N ou N/10 dans l'éthanol ou l'eau	- On ajoute successivement et à quantités égales I puis II à la solution alcoolique à tester - Sur les chromatogrammes on pulvérise I, on sèche puis on pulvérise II.	Rouge
Réaction de Raymond (55,84) ou de Marthoud au métadinitrobenzène	*En solution* : I — Métadinitrobenzène ..... 5 g ; Pyridine ..... 100 ml II — Na OH : N/10 III — Acide borique : N/5	A 1 ml de solution éthanolique à tester, on ajoute 2 ml de I et 0,1ml de II. On stabilise avec 0,05 ml de III.	Bleu (λ max 579 mm)
	En chromatographie : I — Métadinitrobenzène ..... 10 g ; Benzène ..... 100 ml II — Na OH ..... 6 g ; Eau ..... 25 ml ; Méthanol ..... 45 ml	Sur le chromatogramme séché, on pulvérise I, on sèche et on pulvérise II.	Bleu violet (fugace)
Réaction de Frère Jacque au métadinitronaphtalène (26)	I — Métadinitronaphtalène .... 1 g ; Ethanol 95° ..... 100 ml II — Na OH/N	Sur le chromatogramme séché pendant 3 mn à 100°C, on pulvérise I, on sèche et on pulvérise II.	Rouge (stable)
Réaction de Kedde (41) à l'acide dinitro-3,5 benzoïque	*En solution* : I — Acide dinitrobenzoïque .. 2 g ; Ethanol 95° ..... 100 ml II — Na OH/N	A 5 ml de solution à terter on ajoute 5 ml de I, puis 9 ml de II. On complète à 25 ml avec de l'eau.	Violet à pourpre (λ max 530 mm)
	En chromatographie : R — Acide dinitrobenzoïque .. 1 g ; Méthanol ..... 50 ml ; KOH 2N ..... 50 ml	On pulvérise le réactif sur le chromatogramme séché à l'étude à 100°C.	Taches pourpres violacées

TABLEAU VII - Réactions en milieu acide

Réactions	*Réactifs*	*Technique*	*Colorations - Observations*
Acide Sulfurique	H_2SO_4 concentré ou H_2SO_4 à 84 %	Réaction effectuée directement sur les cristaux ou sur leur solution éthanolique.	Coloration variable avec le digitalique et se modifiant avec le temps.
Réaction de Liebermann - Burchard	I Anhydride acétique II H_2SO_4 R Anhydride acétique 20 ml $CHCl_3$ ..... 50 ml H_2SO_4 concentré .. 1 ml	A la solution chloroformique ou acétique du produit on ajoute 1 ml de I, puis une goutte de II. Pulvériser sur le chromatogramme R. Sécher et examiner sous UV.	Coloration variable : positive avec de nombreux cardénolides et bufadiénolides, négative avec les dérivés 17 βH.
Réaction de Lafon ou de Keller-Kiliani	I $FeCl_3$ 10 % ..... 0,3 ml CH_3COOH ..... 50 ml II $FeCl_3$ 10 % ..... 0,3 ml H_2SO_4 concentré .. 50 ml	Le produit est dissout dans I. On ajoute II avec précaution de façon à obtenir 2 phases.	Coloration bleue se formant lentement dans la phase acétique en présence des hétérosides à désoxy-2-oses. Réaction négative avec nos substances.

./....

T A B L E A U VII - Réactions en milieu acide (suite et fin)

Réactions	*R é a c t i f s*	*T e c h n i q u e*	*Colorations - Observations*
Acide Phosphorique	$H_3 PO_4$ (d : 1,7) à 85 % minimum	On ajoute le réactif à la solution du glucoside dans l'acétone.	Coloration jaune se développant après 15 mn à 35°C puis refroidissement (λmax 474 nm-sensibilité $\#$ 2 à 4 γ/ml en désoxyose.
Acide trichloracétique "chloramine T" (p.toluène-sulfamino-chlorure de sodium) I II	Acide trichloracétique 25 % dans l'éthanol. "Chloramine T" à 3 % dans l'eau (solution fraîche)	Sur le chromatogramme, pulvériser I + II dans les proportions (4 : 1) et examiner sous UV.	Fluorescences variables très sensible 0,5 γ
Acide thio-2 barbiturique après oxydation périodique (63) I II III	$H I O_4$ 0,25 N dans $H_2 SO_4$ 0,1 N Arséniate de sodium 2 % dans Hcl Acide thio-2 barbiturique à 0,6 % (pH $\#$ 2).	On ajoute à 3,5 ml de la solution d'hétéroside à désoxyose(c$\#$20γ), 0,5 ml de I,puis après un certain temps (20 mn pour les cis-diols et 40 mn pour les trans-diols) on ajoute 1ml de II et 2ml de III.On porte au bain-marie à 100°C.On refroidit et complète à 100 ml avec l'acétone.	Coloration rouge en présence d'hétérosides à désoxy-2 oses. λ max = 532 nm. Réaction négative avec nos substances.

Chapitre II

ESSAIS PRELIMINAIRES

Nos essais préliminaires ont porté sur les écorces, les feuilles et le suc.

Nous nous sommes attaché surtout à la recherche des hétérosides digitaliques et également des alcaloïdes dans ces différents organes.

En effet, dans un échantillon qualifié "Ipoe Siren" ou "Upas Antiar" mais d'origine botanique incertaine, DOEBEL (22) avait mis en évidence des quantités importantes d'alcaloïdes du groupe de la strychnine à l'exclusion de toute trace d'hétéroside digitalique. Ces recherches ultérieures l'avaient conduit à admettre que cet échantillon ne provenait pas de l'Antiaris toxicaria mais d'une autre plante également utilisée comme poison de flèche en Indonésie.

C'est en nous basant sur cette observation que nous avons cru nécessaire de vérifier la présence ou l'absence d'alcaloïdes dans Antiaris africana.

A - *RECHERCHE DES ALCALOIDES*

1 - Dans les écorces et les feuilles :

A 10 g de poudre de drogue séchée, on ajoute 5 ml d'ammoniaque au 1/2 et 50 ml du mélange éther-chloroforme (3 : 1).

On laisse macérer 24 heures dans un flacon bouché en agitant fréquemment.

La phase organique est filtrée et épuisée dans une ampoule avec de l'acide sulfurique à 5 %. Dans les solutions acides réunies et concentrées les alcaloïdes sont recherchés par les réactifs généraux de précipitation :

- Réactif de Dragendorff ;

- Réactif de Valser-Mayer.

Ces réactions sont négatives pour les feuilles et les écorces dans les quatre échantillons étudiés.

2 - Dans le suc :

Nous opérons sur 100 ml de suc débarrassé des substances résineuses et gommeuses par addition d'éthanol à 95°, qui provoque un précipité abondant.

Le filtrat alcoolique est concentré à 10 ml. L'extrait ainsi obtenu est alcalinisé par 5 ml d'ammoniaque et additionné de 50 ml de mélange éther-chloroforme (3 : 1). La suite des opérations est identique.

Là encore la recherche des alcaloïdes est négative.

B - RECHERCHE DES HETEROSIDES DIGITALIQUES

1 - Dans les écorces et les feuilles :

20 g de poudre de drogue sèche sont extraits au Soxhlet pendant 4 h. par de l'éthanol à 50°. L'extrait alcoolique est agité avec une solution d'acétate basique de plomb. Après élimination de l'excès de plomb par un courant de H_2S, le filtrat est concentré sous pression réduite au 1/4 de son volume. Sur l'extrait obtenu, les digitaliques sont recherchés par les réactifs généraux signalés en solution et après chromatographie sur papier dont nous reparlerons ultérieurement.

Tandis que les feuilles ne contiennent pas d'hétérosides digitaliques, les réactions sont faiblement positives avec les écorces et il apparaît sur les chromatogrammes des trainées à contours diffus mais révélées nettement par le réactif de Kedde, qui traduisent la présence de traces de substances digitaliques.

2 - Dans le suc :

20 ml d'extrait hydroalcoolique, obtenu de la même façon que dans la recherche des alcaloïdes, sont épuisés dans une ampoule par le mélange chloroforme-alcool (2 : 1).

L'extrait chloroformo-alcoolique concentré à quelques ml est examiné en chromatographie sur papier.

Après révélation par le réactif de Kedde il apparaît de nombreux spots violet-pourpre indiquant la présence d'hétérosides digitaliques. Les réactions effectuées directement sur l'extrait sont également fortement positives.

Le suc d'Antiaris africana semble donc contenir une forte proportion d'hétérosides digitaliques, contrairement aux feuilles qui en sont dépourvus et aux écorces qui n'en contiennent que des traces. C'est pourquoi il a fait, seul, l'objet d'une expérimentation ultérieure relative à leur extraction et à leur isolement.

-:-

Chapitre III

EXTRACTION ET PURIFICATION DES HETEROSIDES TOTAUX DU SUC

La méthode employée s'inspire dans ses grandes lignes des techniques utilisées par différents auteurs (DOLDER (23), JUSLEN (38), WEHRLI (102)) pour l'Antiaris toxicaria. Tous les échantillons de suc ont subi le même traitement.

A - EXTRAIT BRUT HYDRO-ALCOOLIQUE

Aussitôt le prélèvement, le suc est additionné d'un égal volume d'alcool à 70^{C} et conservé au réfrigérateur jusqu'au début des opérations d'extraction, soit un mois environ après la récolte.

Chaque échantillon représente environ 1 litre de latex.

Dans tous les flacons il est formé un abondant dépôt marron, qui est éliminé par décantation et filtration sur papier. Ce précipité ne retient pas d'hétérosides digitaliques. Le surnageant, filtré, précipite à nouveau par addition d'alcool à 95^{C}, dont l'addition est poursuivie jusqu'à cessation du précipité qui est essentiellement constitué de résines, de gommes et d'autres matières inertes. L'absence d'hétérosides digitaliques est vérifiée par les réactifs de Legal, de Raymond-Marthoud et de Kedde.

Les filtrats hydroalcooliques sont réunis et fortement concentrés sous pression réduite à l'évaporateur rotatif.

Au cours de cette opération, il se dépose sur les parois du ballon une substance résineuse jaune non digitalique, cristallisable dans l'alcool absolu :

$$\frac{\text{Point de fusion des cristaux}}{\text{(banc de Kofler)}} = 180°C$$

Elle correspond probablement à la *"résine antiar"* signalée par KILIANI (46) et DE VRY-LUDWIG (21) dans le suc d'Antiaris toxicaria.

B - TRAITEMENT A L'ACETATE BASIQUE DE PLOMB

L'extrait hydro-alcoolique débarrassé de la majeure partie de résine est ajusté à pH 5.5 - 6 avec $H_2 SO_4$ à 1/10e, puis additionné d'acétate basique de plomb en quantité suffisante. Il se forme un abondant précipité éliminé par filtration sur verre fritté.

L'excès de plomb est détruit par un courant de H_2S. On filtre à nouveau ; le filtrat est concentré au 1/5e du volume initial de suc, soit environ 200 ml.

L'extrait ainsi obtenu, limpide, brun clair, est soumis à la chromatographie sur papier.

Nota : Des essais de purification sur charbon activé ont été également effectués. Ils donnent de moins bons résultats car le charbon adsorbe en même temps que les résines une importante quantité d'hétérosides digitaliques.

C - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT HYDRO-ALCOOLIQUE BRUT (10 - 13 - 34)

Nous employons du papier whatmann n°1 sur lequel nous déposons 20 µl de l'extrait précédent.

- *Solvant de migration* : Toluène - isopropanol (63 : 37), saturé d'eau. Huit heures de migration sont nécessaires pour obtenir des spots bien délimités.

- *Révélateur* : Réactif de Kedde.

Les extraits hydro-alcooliques des quatre échantillons ont été ainsi examinés, en présence d'échantillons témoins.

Les résultats sont indiqués dans les schémas des chromatogrammes (fig. 3).

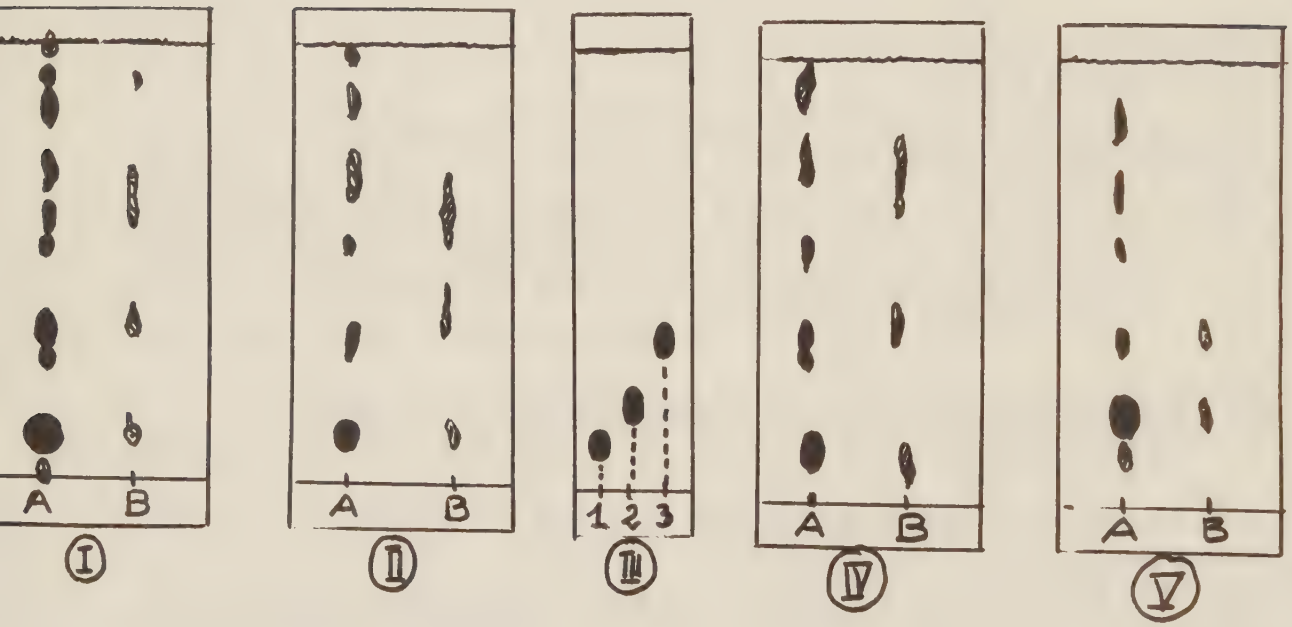
Nous pouvons déjà noter :

- la présence de substances digitaliques migrant au même niveau que la β-antiarine et l'antioside dans les échantillons n° 1, 2 et 3,
- un spot supplémentaire plus intense, de même niveau que l'α-antiarine, dans l'échantillon n°4,
- la présence d'environ dix autres constituants.

SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

DES EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES TOTAUX

Solvant { Toluène ..... 63 / Isopropanol 37 } saturé d'eau



A = Suc { I : échantillon n°1 / II : échantillon n°2 / III : échantillons témoins }

B = Ecorces { IV : échantillon n°3 / V : échantillon n°4 }

{ 1 = β-antiarine / 2 = α-antiarine / 3 = Antioside }

FIGURE III

D - EXTRACTION FRACTIONNEE

Les extraits hydro-alcooliques sont soumis à une extraction fractionnée par agitations répétées dans une ampoule à décantation avec les solvants suivants employés successivement :

1) éther éthylique : 1 l en fractions de 200 ml ;

2) chloroforme : 1 l en fractions de 50 ml ;

3) chloroforme-éthanol 95^{c} (2:1) : 2 l en fractions de 100 ml ;

4) chloroforme-éthanol 95^{c} (3:2) : 2 l en fractions de 100 ml.

Les solutés ainsi obtenus sont déshydratés sur $Na_2 SO_4$ sec. Les filtrats sont concentrés à sec à basse température sous pression réduite dans un évaporateur rotatif.

Les résidus sont maintenus pendant une nuit dans un dessicateur sous vide en présence d'anhydride phosphorique et d'"Actigel" (gel de silice activé) puis pesés.

Les rendements en extraits bruts sont calculés en g par l de suc.

Ils figurent au tableau VIII qui indique également l'intensité des réactions de Kedde et de Raymond fournies par les différents extraits.

Nota : Après le dernier épuisement par le mélange chloroforme-alcool (3 : 2), la réaction de Kedde est encore faiblement positive avec les eaux-mères, qui, après concentration, ne fournissent que quelques mg de produit résinifié.

Extraits	*Echantillons : g/l*				*Réactions*	
	n° 1	*n° 2*	*n° 3*	*n° 4*	*Raymond-Marthoud*	*Kedde*
Ethérés	0,30	0,20	0,45	0,36	-	-
Chloroformiques	0,50	0,25	0,33	0,40	+-	+
Chloroformo-alcooliques (2 : 1)	10	2,50	5,50	6	+++	+++
Chloroformo-alcooliques (3 : 2)	2	1	2	2	++	++

T A B L E A U VIII

Ainsi donc :

1) Le mélange : chloroforme-alcool (2 : 1) permet la meilleure extraction tant au point de vue qualitatif que quantitatif.

2) La période la plus favorable pour la récolte du suc se situe vraisemblablement en juin-juillet (échantillon n°1), période correspondant à la floraison de l'arbre.

3) La teneur en extraits totaux des échantillons 3 et 4 ne présente pas de différence sensible.

E - PURIFICATION DES EXTRAITS BRUTS

La purification n'a porté que sur les extraits chloroformo-alcooliques (2 : 1) et chloroformo-alcooliques (3 : 2) pour lesquels les rendements sont les plus importants et les réactions les plus positives.

Chacun est traité comme suit :

1) Il est repris par la chloroforme en quantité assez importante pour dissoudre la presque totalité du résidu.

2) Le filtrat de la solution chloroformique est lavé successivement par les solvants suivants employés en faibles quantités :

   - eau distillée,
   - Hcl 2 N,
   - $Na_2 CO_3$ 2 N,
   - eau distillée.

3) La solution ainsi purifiée est déshydratée par passage sur $Na_2 SO_4$ pur sec, puis filtrée sur verre fritté n°4.

4) Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite.

Les résidus ainsi débarrassés d'un certain nombre d'impuretés (sucres, sels, etc...) sont à nouveau desséchés pendant 48 h. sous vide phosphorique et pesés.

Les rendements en extraits purifiés sont donnés dans le tableau IX en g par l de suc.

Extraits purifiés	*Echantillons g/l*				*Total*
	n° 1	*n° 2*	*n° 3*	*n° 4*	*g/l*
Chloroformo-alcooliques (2:1)	9	2	5	5,3	21,3
Chloroformo-alcooliques (3:2)	1,75	0,80	1,80	1,6	5,95
Total g/l	10,75	2,80	6,80		
	M1 = 20,35 g			M2 = 6,9 g	

T A B L E A U IX

Chapitre IV

ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES EXTRAITS PURIFIES (23 - 38)

La chromatographie sur papier des extraits purifiés fournit des renseignements plus précis.

A - *TECHNIQUES*

Nous opérons sur du papier whatmann n°1.

- Par chromatographie ascendante avec développements multiples sur papier imprégné d'eau.
- Par chromatographie descendante avec développements à front limité ou à front perdu sur papier imprégné de formamide.

1 - Traitement du papier :

Pour l'imprégnation, le papier est mis à tremper dans un mélange eau-acétone ou dans une solution acétonique de formamide à 20 %, puis essoré entre deux feuilles de papier filtre et séché à l'air. Après évaporation complète de l'acétone, on dépose la solution de substance à analyser. Le papier est suspendu dans la cuve à chromatographie, dont les parois sont tapissées de papier filtre imprégné d'eau pendant au moins 12 h. pour assurer l'équilibre entre l'atmosphère de la cuve (phase mobile) et l'eau (phase fixe saturante de tous les systèmes de solvants employés). Il est ensuite plongé dans le solvant mobile de développement préalablement disposé dans la cuve.

En chromatographie descendante nous déposons la solution à 10 cm du bord supérieur du papier de façon à réserver la zone qui doit s'adapter dans l'augette contenant le solvant.

Pour les migrations à "front perdu" nous procédons sur du papier au bas duquel, nous avons au préalable découpé une série de dents

de scie en vue d'éviter la déformation de la trajectoire des spots.

2 - Dépôt des solutions :

- *Extraits :* - 20 µl de solution méthanolique à 1 g p. 100 ml.
- *Témoins :* - 10 µl de solution méthanolique à 1 g p. 1.

3 - Solvants de migration :

Plusieurs solvants ont été essayés :

a) En chromatographie ascendante :

a - Toluène-isopropanol (63 : 37) : / saturé d'eau
b - Toluène-isobutanol (82 : 18) : / " "
c - Toluène-isobutanol (96 : 4) : / " "
d - Toluène-isobutanol (50 : 50) : / " "

b) En chromatographie descendante :

a - Xylol-méthyléthylcétone (2 : 1) : / saturé d'eau
b - Xylol-méthyléthylcétone (1 : 1) : / " "
c - Xylol-méthyléthylcétone (3 : 1) : / " "
d - Chloroforme-Tétrahydrofuranne-Formamide : (50 : 50 : 6,5)
e - Chloroforme-méthanol (1 : 1)
f - n-butanol-toluène (9 : 1) : / saturé d'eau
g - n-butanol-toluène (1 : 1) : / " "
h - Méthyléthylcétone-Toluène (4 : 1) : / " "

Les meilleures séparations ont été obtenues dans le premier groupe avec les solvants a et d, dans le deuxième groupe avec les solvants f, g, h.

4 - Révélateur :

Réactif de Kedde (Acide 3-5 dinitro-benzoïque en solution alcaline).

B - RESULTATS

Parmi les très nombreux chromatogrammes réalisés nous ne retiendrons que les plus significatifs (fig. 4).

Les chromatogrammes confirment et précisent les résultats préliminaires obtenus avec l'extrait hydro-alcoolique total de chaque échantillon :

1) Une dizaine de substances digitaliques au total ont été décelées, si nous négligeons les taches d'apparition inconstante.

   Nous les numérotons de X_1 à X_{10} par Rf décroissants et en commençant par les spots les plus intenses.

2) Les échantillons 1, 2 et 3, qui rappelons-le, proviennent du même arbre mais ont été récoltés à des périodes différentes de l'année, contiennent surtout des substances dont les Rf correspondent à ceux de :
   - la β-antiarine (X_5)
   - l'antioside (X_3)
   - la Convallatoxine (X_2)

   Les autres composants sont en très faible proportion et leurs coefficients de migration ne correspondent à ceux d'aucun des échantillons de référence dont nous disposions (*).

   Cependant les Rf de X_1 se rapprochent de ceux que rapportent la littérature pour la "substance E de Dolder" (23).

3) L'échantillon n°1 semble contenir, d'après l'intensité des spots, la plus forte proportion de X_5 (β-antiarine).

4) Le composant X_4 (α-antiarine) qui n'a été décelé dans aucun des trois premiers échantillons apparaît en proportion importante dans les extraits de l'échantillon n°4, qui contient également en plus faible proportion X_5.

5) Pour les autres composants mineurs, l'aspect général des chromatogrammes ainsi que l'intensité des taches sont à peu près identiques pour les quatre échantillons.

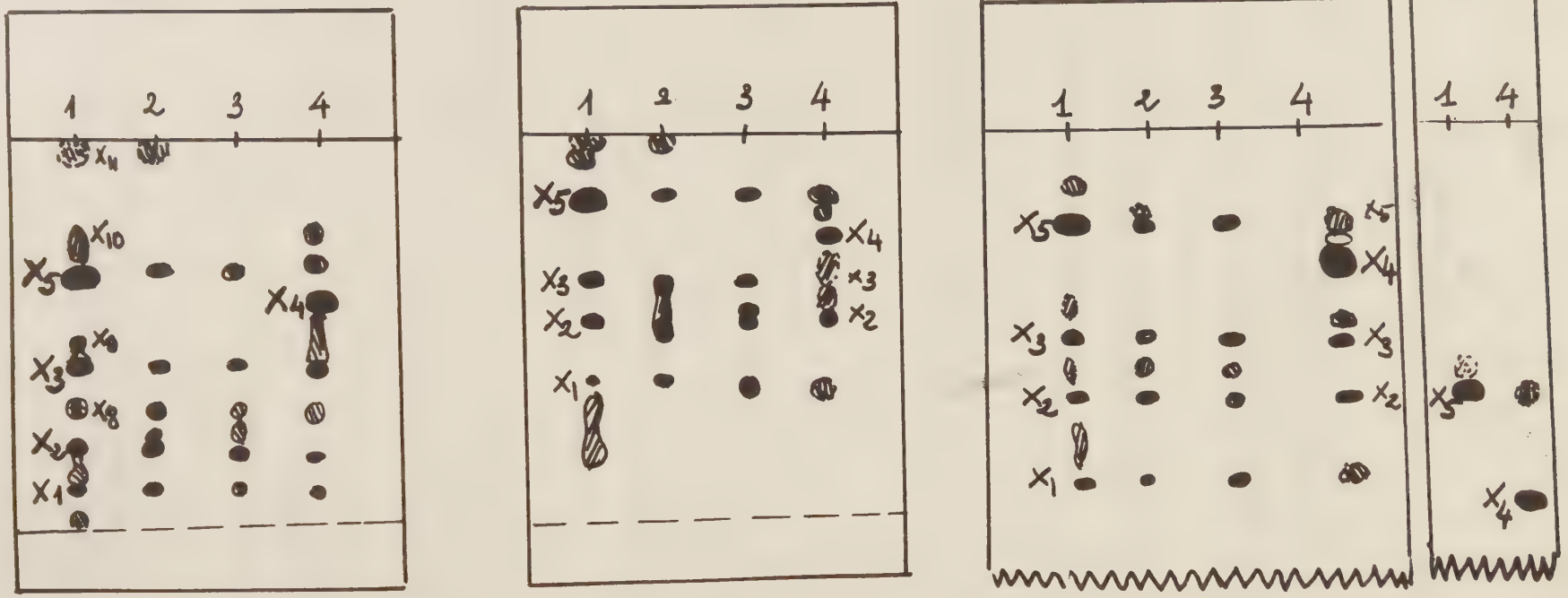
(*) Nous sommes reconnaissant au Professeur REICHSTEIN et aux Laboratoires Coba qui nous ont si aimablement procuré ces échantillons.

SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES EXTRAITS TOTAUX. Chloroforme-alcool (2:1)

1 { n-Butanol-Toluène (9:1) saturé d'eau — 15 h.

2 { n-butanol-Toluène (1:1) saturé d'eau — 8 h.

3 { n-butanol-Toluène (1:1) saturé d'eau — 26 h. — 45 h.



1 = Extraits totaux de l'échantillon n°1 - 3 = Extraits totaux de l'échantillon n°3
2 = Extraits totaux de l'échantillon n°2 - 4 = Extraits totaux de l'échantillon n°4

FIGURE IV

6) Dans tous les cas les extraits chloroformo-alcooliques (2 : 1) et chloroformo-alcooliques (3 : 2) contiennent les mêmes substances.

Ces observations nous amènent à distinguer deux groupes d'extraits en vue de l'isolement de leurs constituants :

- *Premier mélange à fractionner :*

Totalité des extraits chloroformo-alcooliques (2 : 1) et chloroformo-alcooliques (3 : 2) des échantillons n° 1, 2 et 3 ; la β-antiarine (X_5) en est le constituant principal.

Soit $M_1 = 20,35\ g$ obtenus à partir de 3 l de latex.

- *Deuxième mélange à fractionner :*

Totalité des extraits chloroformo-alcooliques (2 : 1) et (3 : 2) provenant de l'échantillon n°4 et constitués surtout par l'α-antiarine (X_4).

Soit $M_2 = 6,9\ g$ obtenus à partir de 1 litre de latex.

-:-

Chapitre V

ISOLEMENT DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS

Nos premiers essais d'isolement, par passage direct sur colonne des mélanges M_1 et M_2, se sont révélés infructueux. La plupart des constituants se trouvant à l'état de traces avec des Rf très voisins, gênent la séparation des composants majeurs.

Nous avons pensé tourner la difficulté en procédant d'abord à des essais de cristallisation fractionnée qui permettraient d'éliminer les substances mineures dans les eaux-mères. Nous sommes ainsi parvenu à une bonne séparation des constituants des mélanges cristallins ainsi isolés.

A - ESSAIS DE CRISTALLISATION FRACTIONNEE A PARTIR DES MELANGES M_1 et M_2

Les meilleurs résultats ont été fournis par le mélange éthanol-eau selon le protocole suivant :

- L'extrait total est dissout dans le minimum de méthanol à chaud. On ajoute de l'eau par petites fractions jusqu'à début de trouble ; le soluté opalescent est alors concentré sous pression réduite. Une cristallisation s'amorce.

Nous laissons alors se déposer dans un vase couvert à la température ambiante pendant 48 h. Le précipité, qui contient un mélange de cristaux de formes variables, est recueilli sur verre fritté et redissout à nouveau dans le minimum de méthanol et recristallisé par addition d'eau.

Cette opération est renouvelée trois fois.

Les deux résidus cristallins M'_1 et M'_2 issus respectivement de M_1 et M_2, sont séparés des dernières eaux-mères, desséchés sous vide phosphorique et pesés.

Nous obtenons ainsi :

- à partir de M_1 (20,35 g) → M'_1 = 11 g
- à partir de M_2 (6,9 g) → M'_2 = 4,5 g

B - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES DEUX FRACTIONS M'_1 et M'_2

Examinés en chromatographie sur papier selon les modalités décrites, les deux mélanges cristallins ne présentent plus que quelques taches révélées intensément par le réactif de Kedde et à Rf bien définis (fig. V).

- M'_1 : 5 spots dont 3 migrent aux mêmes niveaux que les témoins, et qui sont par suite identifiés à :
  - la β-antiarine = X_5
  - l'antioside = X_3
  - la Convallatoxine = X_2

- M'_2 : 4 spots dont 3 correspondent aux Rf de :
  - l'α-antiarine = X_4
  - l'antioside = X_3
  - la Convallatoxine = X_2

Ainsi, parmi la dizaine de constituants contenus initialement dans les mélanges M_1 et M_2, on ne retrouve plus que les composants principaux dans les mélanges cristallins M'_1 et M'_2. Les opérations d'isolement s'en trouvent infiniment facilitées.

Les eaux-mères de cristallisation qui ne contiennent plus que de faibles proportions de chacun des constituants n'ont pas été étudiées.

C - ISOLEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DES CONSTITUANTS DE M'_1 ET M'_2. IDENTIFICATION DES HETEROSIDES ISOLES.

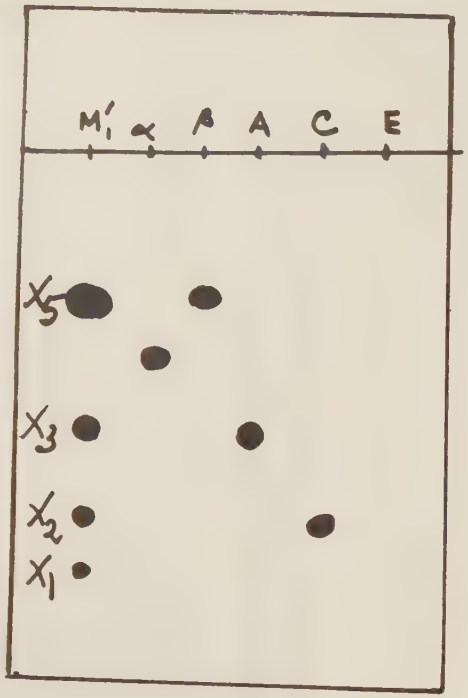
Deux essais préliminaires nous ont permis de choisir le système le mieux adapté à la séparation.

SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE DES MELANGES CRISTALLINS M'_1 et M'_2

A - Chromatographie sur papier

Solvant :

n-butanol-toluène (9:1)
saturé d'eau
(15 h.)



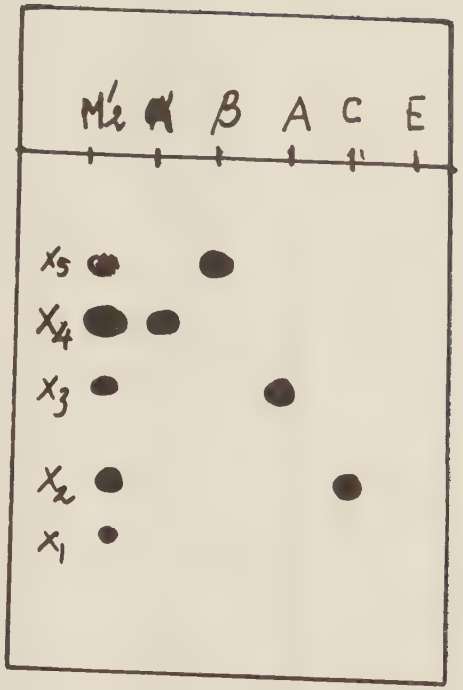
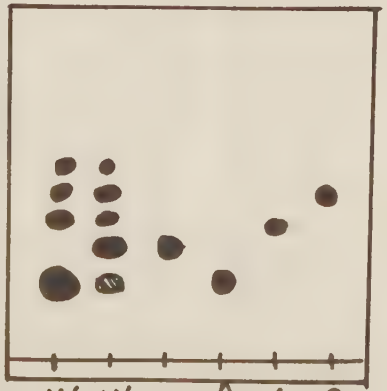


FIGURE V

B - Chromatographie sur couche mince Kieselgel G.

1 { Acétate d'éthyle 100 / Méthanol 16,5 / Eau 13,5



2 { Acétate d'éthyle 12 / Pyridine 5 / Eau 4

1 - PREMIER ESSAI : CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE DE SILICE (Kieselgel Merck, grosseur de grains 0,05 - 0,2 mm)

Dans une allonge cylindrique en verre de 55 x 2 cm nous introduisons par petites fractions 12 g d'adsorbant à sec. Après chaque addition la poudre est tassée soigneusement à l'aide d'un bouchon en caoutchouc fixé sur une tige de verre.

D'autre part 500 mg de l'un ou l'autre des deux mélanges cristallins (M'_1 ou M'_2) sont dissous dans le minimum de méthanol. La solution est mélangée intimement dans un mortier avec 4 g d'adsorbant.

La suspension pâteuse obtenue est évaporée à sec sous pression réduite pour chasser complètement le solvant.

Le mélange homogène de poudre de silice et d'extrait est ensuite versé avec précaution au dessus de la colonne préparée comme il vient d'être indiqué. L'ensemble est recouvert d'une rondelle de papier filtre et d'une faible épaisseur de sable pur (de Fontainebleau).

On procède à l'élution en commençant par du chloroforme qui est progressivement enrichi en méthanol (de 0,1 à 10 % en volumes).

Cet essai de chromatographie d'adsorption sur silice n'a pas permis une séparation convenable des constituants de M'_1 et M'_2.

Dans les chromatogrammes des fractions éluées, nous observons toujours deux spots au minimum.

Nous ne l'avons donc pas retenu et nous lui avons substitué une autre technique.

2 - DEUXIEME ESSAI : CHROMATOGRAPHIE DE PARTITION SUR COLONNE DE KIESELGUHR : EAU

Dans une colonne identique à la précédente nous introduisons un mélange de Kieselguhr - Eau (1 : 1, p/v) en suspension dans du benzène pur.

La colonne est tassée soigneusement en prenant bien soin d'éliminer les bulles d'air.

500 mg de M'_1 ou M'_2 sont dissous dans le minimum du mélange solvant : chloroforme - acétone (1 : 1) ; la solution est mélangée intimement avec 3 g de mélange Kieselguhr - Eau.

Les solvants organiques sont évaporés à basse pression, le résidu est déposé au sommet de la colonne et recouvert d'une rondelle de papier filtre. Avant le développement proprement dit, la colonne est

d'abord lavée avec du benzène pur en vue d'éliminer les traces d'impuretés résineuses qui accompagnent encore les substances.

Nous procédons ensuite à l'élution en commençant par du chloroforme auquel nous ajoutons progressivement du butanol en proportions croissantes selon la programmation indiquée dans les tableaux n° X et XI.

Au cours de cet essai préliminaire, la méthode nous a permis de séparer la plupart des constituants de M'_1 et de M'_2. Nous l'avons donc appliquée à la totalité de ces mélanges.

- Soit 10 g pour M'_1.
- Soit 3,5 g pour M'_2.

3 - ISOLEMENT DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE LA TOTALITE DES MELANGES M'_1 ET M'_2 PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR COLONNE DE KIESELGUHR-MERCK (terres d'infusoires) - EAU

- Pour des raisons d'ordre technique nous avons réparti les 10 g de M'_1 en trois fractions (3,5 g ; 3,5 g et 3 g) ; chacune a été traitée dans une colonne de 100 x 3 cm selon les mêmes modalités que dans l'essai préliminaire.

- La chromatographie de la totalité de M'_2 (3,5 g) a été réalisée dans une colonne de 100 x 3 cm. A chaque opération nous utilisons environ 750 g de Kieselguhr-Eau (1 : 1) et les fractions recueillies sont de 200 ml.

Résultats :

- Le tableau X rend compte du mode de séparation des constituants de M'_1 ainsi que de l'identification des substances isolées par chromatographie et par les réactions colorées.

- Le tableau XI rend compte du fractionnement de M'_2 et de l'identification des constituants isolés.

(Voir tableaux X et XI, pages suivantes).

TABLEAU X - Isolement par chromatographie de partage sur colonne de Kieselguhr/Eau des Hétérosides du mélange M'_1 (10 g).

ELUANT	Volume total (ml)	Fractions (n°)	Rf. ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE					Réaction Kedde	Substances isolées	Identification
			Sur papier		C.C.M. Kieselgel					
			Butanol-Toluène (9:1)- 15 h	Butanol-Toluène (1:1) - 8 h	Acétate d'éthyle 100	CH_3OH 16,5	H_2O 13,5			
Benzène	500		néant	néant	néant			-		
Benzène-chloroforme (1 : 1)	1000	1 - 5	néant	néant	néant			-		
Chloroforme	2000	6 - 15	néant	néant	néant			+-		
Chloroforme-butanol (99: 1)	2200	16 - 26	0,90	0,65	0,55			+	X_1	"Substance E Dolder"
" " (95: 5)	2000	27 - 36	0,90 & 0,72	0,65 & 0,48	0,55 & 0,50			+	$X_1 + X_2$	
" " (90:10)	2400	37 - 48	0,72	0,48	0,50			+	X_2	Convallatoxine
" " (90:10)	600	49 - 51	0,72 & 0,60	0,48 & 0,30	0,50 & 0,42			+	$X_2 + X_3$	
" " (85:15)	2000	52 - 61	0,72 & 0,60	0,48 & 0,30	0,50 & 0,42			+	$X_2 + X_3$	
" " (80:20)	2000	62 - 71	0,60	0,30	0,42			++	X_3	Antioside
" " (80:20	800	72 - 75	0,60	0,30	0,42			++	X_3	Antioside
" " 75:25	1800	76 - 84	0,60	0,30	0,42			++	X_3	Antioside
" " 70:30	2000	85 - 94	0,60 & 0,35	0,30 & 0,17	0,42 & 0,25			++	$X_3 + X_5$	
" " 65:35	2000	95 - 114	0,60 & 0,35	0,30 & 0,17	0,42 & 0,25			++	$X_3 + X_5$	
" " 60:40	2000	115 - 124	0,35	0,17	0,25			+++	X_5	β-antiarine
" " 50:50	3000	125 - 139	0,35	0,17	0,25			+++	X_5	β-antiarine
" " 45:55	1000	140 - 144	0,35	0,17	0,25			+++	X_5	β-antiarine
" " 40:60	1000	145 - 149	néant	néant	néant			-		

TABLEAU XI - Isolement par chromatographie de partage sur colonne de Kieselguhr/Eau des Hétérosides de M'_2 (3,5 g).

ELUANT	Volume total (ml.)	Fractions (n°)	ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE				Substances isolées	Identification
			Rf : Papier		Rf : C.C.M. Kieselgel	Réaction Kedde		
			n-butanol-Toluène (99:1) (15h)	n-butanol-Toluène (1:1) (8h)	Acétate d'éthyle 100 Méthanol ..... 16,5 Eau 13,5			
Benzène	500		néant	néant	néant	-		
Benzène-Chloroforme	500	1 - 2	néant	néant	néant	-		
Chloroforme	1000	3 - 7	néant	néant	néant	-		
Chloroforme-butanol (99: 1)	1000	8 - 12	0,90	0,65	0,55	+	X_1	"Substance E. Dolder"
" " (95: 5)	1000	13 - 17	0,90	0,65	0,55	+	X_1	"Substance E. Dolder"
" " (90:10)	1000	18 - 22	0,90 & 0,72	0,65 & 0,48	0,55 & 0,50	+	$X_1 + X_2$	
" " (90:10)	600	23 - 25	0,72	0,48	0,50	+	X_2	Convallatoxine
" " (85:15)	1000	26 - 30	0,72	0,48	0,50	+	X_2	Convallatoxine
" " (80:20)	400	31 - 32	0,72	0,48	0,50	+	X_2	Convallatoxine
" " (80:20)	600	33 - 35	0,72 & 0,60	0,48 & 0,30	0,50 & 0,42	+	$X_2 + X_3$	
" " (75:25)	1000	36 - 40	0,72 & 0,60	0,48 & 0,30	0,50 & 0,42	+	$X_2 + X_3$	
" " (70:30)	1000	41 - 45	0,60	0,30	0,42	++	X_3	Antioside
" " (70:30)	600	46 - 48	0,60	0,30	0,42	++	X_3	Antioside
" " (65:35)	1000	49 - 53	néant	néant	néant	-		
" " (60:40)	1000	54 - 58	néant	néant	néant	-		
" " (50:50)	2000	59 - 68	0,40	0,25	0,35	+++	X_4	α-antiarine
" " (45:55)	2000	69 - 78	0,40	0,25	0,35	+++	X_4	α-antiarine
" " (40:60)	1000	79 - 83	néant	néant	néant			

4 - IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS ISOLES

Les différents éluats ont été évaporés à sec sous pression réduite à l'évaporateur rotatif et soumis à la chromatographie sur papier et sur couche mince comparativement aux échantillons témoins.

a) Technique :

- Chromatographie sur papier :

Nous opérons selon les mêmes modalités que pour les extraits totaux.

Les dépôts sont de 10 µl de solution méthanolique à 1 % des extraits fournis par les éluats.

- Chromatographie sur couche mince de Kieselgel-Merck :

Elle présente l'avantage d'une exécution plus rapide surtout pour l'étude comparative des fractions d'élution.

1°) Préparation des plaques :

Pour 5 plaques de verre de 20 x 20 cm nous préparons une suspension homogène d'adsorbant :

Kieselgel G. Merck ..... 30 g
Eau distillée ..... 60 ml

L'étalement est effectué à l'aide de l'étaleur automatique "CAMAG" sur une épaisseur de 0,30 mm.

Les plaques sont ensuite activées à l'étude à 120°C pendant 30 mn.

2°) Dépôts :

10 µl de solution méthanolique à 1 %.

3°) Solvants de migration :

Plusieurs solvants ont été essayés :

α) chlorure de méthylène - méthanol - eau (84 : 15 : 1)

β) chloroforme - méthanol (9 : 1) ou (7 : 3)

γ) acétate d'éthyle - pyridine - eau (5 : 1 : 4) (phase supérieure)

δ) acétate d'éthyle - méthanol - eau (100 : 16,5 : 13,5).

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le solvant δ.

4°) Révélateur : réactif de Kedde.

b) Résultats :

Quelques-uns des Rf obtenus en chromatographie sur papier et sur couche mince sont rapportés dans le tableau XII.

Les fractions présentant les mêmes constituants ont été réunies et pesées.

Nous obtenons ainsi :

1°) à partir du mélange M'_1 (10 g) :

- *110 mg de la substance X_1 :* Rf 0,90 dans Butanol-Toluème (9:1)
- *200 mg de la substance X_2 :* Rf 0,72 " " "
- *1,70 g de la substance X_3 :* Rf 0,60 " " "
- *3,30 g de la substance X_5 :* Rf 0,35 " " "

2°) à partir du mélange M'_2 (3,5 g) :

- *50 mg de la substance X_1*
- *875 mg de la substance X_2*
- *230 mg de la substance X_3*
- *1,175 g de la substance X_4 :* Rf 0,40.

Les autres fractions contiennent des mélanges de 2 constituants qui n'ont pas été séparés.

- Nous sommes donc parvenus à isoler au total 5 substances, ainsi que leurs réactions colorées effectuées comparativement aux témoins avec H_2SO_4 concentré et H_2SO_4 à 84 % permettent de confirmer les identifications faites précédemment :

- X_1 = "Substance E. de Dolder" : 160 mg
- X_2 = Convallatoxine : 1075 mg
- X_3 = Antioside : 1930 mg
- X_4 = α-antiarine : 1175 mg
- X_5 = β-antiarine : 3300 mg

5 - PURIFICATION DES HETEROSIDES ISOLES

Avant d'entreprendre leur étude analytique, les substances ont été au préalable purifiées.

Chacune est dissoute dans le minimum du mélange méthanol-eau (1:6).

Le méthanol est éliminé sous pression réduite et la solution aqueuse est agitée plusieurs fois avec de petites quantités de mélange chloroforme-alcool (2:1) jusqu'à absence de réaction avec le réactif de Kedde.

Les extraits chloroformo-alcooliques sont réunis dans une deuxième ampoule et lavés deux à trois fois avec de petites quantités d'eau. Ils sont ensuite desséchés sur $Na_2 SO_4$ anhydre, évaporés à sec sous pression réduite à température inférieure à 50°C et maintenus sous vide phosphorique dans un dessicateur pendant 48 h.

On termine leur purification par des essais de cristallisation fractionnée dans différents mélanges : acétone-éther, acétone-eau, méthanol-éther, méthanol-eau.

- Les substances X_1 et X_2 ne cristallisent dans aucun de ces solvants. Elles restent sous forme de poudre amorphe blanchâtre.
- La substance X_3 (antioside) cristallise dans le mélange acétone-éther en aiguilles incolores.
- La substance X_4 (α-antiarine) cristallise dans le mélange méthanol-eau en paillettes hexagonales.
- La substance X_5 (β-antiarine) cristallise dans le mélange méthanol-éther en aiguilles incolores.

6 - ANALYSE ELEMENTAIRE (*)

TABLEAU XII

Hétérosides	*Formule brute*	*Poids moléculaire*	*Analyse élémentaire %*					
			Calculé			*Trouvé*		
			C %	*H %*	*O %*	*C %*	*H %*	*O %*
X_1="Substance E.de Dolder"	$C_{29}H_{44}O_{11}$	568	61,26	7,74	31,00	61,30	7,45	31,36
X_2=Convallatoxine	$C_{29}H_{42}O_{10}$	550	63,27	7,64	29,09	63,12	7,85	30,14
X_3=Antioside	$C_{29}H_{44}O_{10}$	552	63,04	7,97	28,99	63,45	8,15	29,05
X_4=α-Antiarine	$C_{29}H_{42}O_{11}$	566	61,66	7,42	30,92	59,48	7,92	32,60
X_5=β-Antiarine	$C_{29}H_{42}O_{11}$	566	61,66	7,42	30,92	61,25	7,60	31,15

(*) Nous remerçions le "Service Central de microanalyse - CNRS Gif-sur-Yvette", d'avoir bien voulu effectuer les analyses de nos produits.

TABLEAU XIII - Etude chromatographique des hétérosides et de leurs dérivés.

Substances identifiées	Rf absolu ou relatif CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER Whatmann n°1									C.C.M. Kieselgel		
	n-butanol 9 Toluène 1 15 h	n-butanol 1 Toluène 1 8 h	n-butanol 1 Toluène 1 26 h	n-butanol 1 Toluène 1 45 h	Méthyléthylcét. Toluène (4:1) 24 h	Formamide Benzène 3 h	Benzène 9 $CHCl_3$ 1 3 h	Benzène 40 Méthanol 60	MeK 50 Xylol 50	CH_3OET 100 CH_3OH 16,5 Eau 13,5	CH_3OET 12 Pyridine 5 Eau 4	CH_3OET 70 Isopropanol 15 CH_3OH 15
Hétérosides												
X_1="Substance E. de Dolder"	0,90	0,65	0,80		0,95					0,55		
X_2=Convallatoxine	0,72	0,48	0,60		0,78					0,50		
X_3=Antioside	0,60	0,30	0,45		0,65					0,42		
X_4=α-Antiarine	0,40	0,25	0,31	0,86	0,53					0,35	0,90	
X_5=β-Antiarine	0,35	0,17	0,20	0,60	0,35					0,25	0,83	
Génines												
Antiarigénine		0,55			0,50						0,75	
Antiogénine		0,65			0,70						0,60	
Strophantidine		0,70			0,75			0,15	0,40		0,40	
Sucres												
L Rhamnose											0,56	0,27
Desoxygulose											0,33	0,11
Acétates												
Acétate de β-antiarine						0,30	0,60					
Acétates d'α-antiarine						0,45	0,65-0,75					
Acétate d'antioside						0,58	0,80					

Chapitre VI

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES HETEROSIDES

A - *PROPRIETES PHYSIQUES*

1 - SOLUBILITES

Tous les produits isolés sont insolubles dans l'éther, très peu solubles dans l'eau froide, assez peu solubles dans le chloroforme.

Ils sont plus solubles dans l'eau chaude, l'acétone et l'éthanol à 95°, très solubles dans le méthanol.

2 - POINTS DE FUSION

Ils ont été déterminés, au banc de Kofler sur les produits purifiés et séchés sous vide poussé.

Les points de fusion des mélanges d'épreuve des produits avec les témoins auxquels ils ont été identifiés n'affectent aucune variation.

	F. théorique	*F. trouvé*
- α-*antiarine*	247 - 250°C	235 - 240°C
- β-*antiarine*	233 - 240	220 - 230
- *Antioside*	248 - 258 191 - 210°	190 - 200
- *Convallatoxine*	232 - 238	235 - 240
- *"Substance E de Dolder"*	264 - 272	260 - 270

3 - POUVOIRS ROTATOIRES

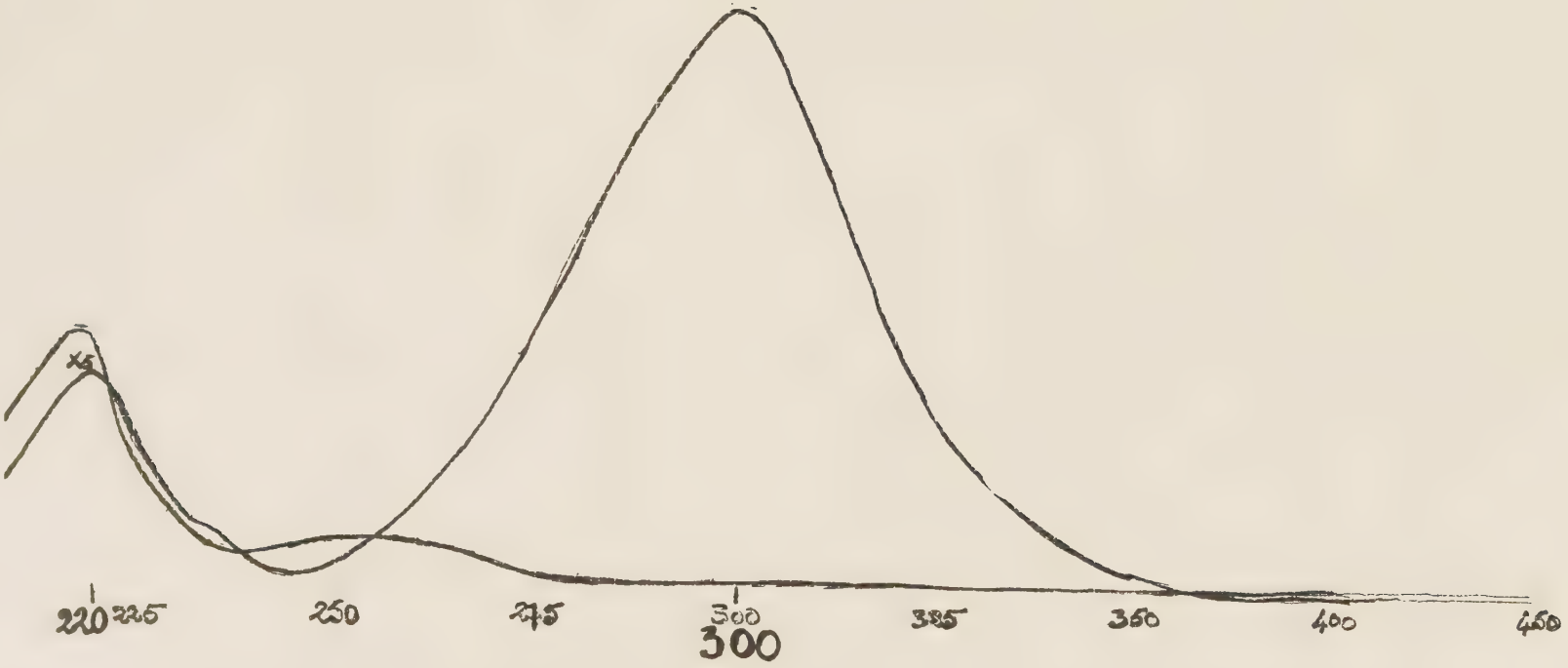
Ils ont été déterminés en solution à 1 % dans le méthanol en tube de 1 dm au polarimètre Perkin Elmer 141 - MC.

	$(\alpha)_D$ *théorique*	$(\alpha)_D$ *trouvé*
- α-*antiarine*	- 6,5 ± 2	- 5 ± 1
- β-*antiarine*	+ 3 ± 2	+ 5 ± 1
- *Antioside*	- 9,8 ± 2	- 8 ± 1
- *Convallatoxine*	+ 1,3	+ 1,5 ± 1
- *"Substance E.de Dolder"*	- 45 ± 3	- 43 ± 2

4 - ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET (fig. VI)

Elle a été mesurée sur des solutions éthanoliques à 1/50 000 au spectrophotomètre enregistreur UNICAM SP 800.

Tous nos produits absorbent surtout à λmax : 220 nm, ce qui correspond au maximum d'absorption du cycle lactonique pentagonal insaturé. De plus, l'α-antiarine, la β-antiarine, la convallatoxine et la substance E.de Dolder présentent un maximum à 300 nm qui correspond au carbonyle aldéhydique en 19 ; l'antioside qui ne le possède pas, n'absorbe pas à cette longueur d'onde.



F I G U R E VI - *Spectre UV*
β-antiarine (X_5)
et antioside (X_3)

5 - SPECTROGRAPHIE INFRAROUGE

Les spectres d'absorption dans l'infrarouge ont été enregistrés sur un spectrographe Perkin-Elmer 237 à réseaux (4000 - 625 cm^{-1}), les produits étant en suspension dans le nujol.

Les spectres des substances isolées coïncident parfaitement avec ceux des témoins auxquels elles ont été identifiées.

Nous notons surtout les bandes d'absorption caractéristiques suivantes :

- 1740 - 1750 cm^{-1} : cycle lactonique insaturé,
- 1720 - 1730 cm^{-1} : groupement aldéhydique en 19.

Cette dernière bande n'existe pas dans le spectre de l'antioside.

Les différents spectres obtenus sont reproduits dans les figures VII - VIII - IX - X.

(Voir figures page suivante).

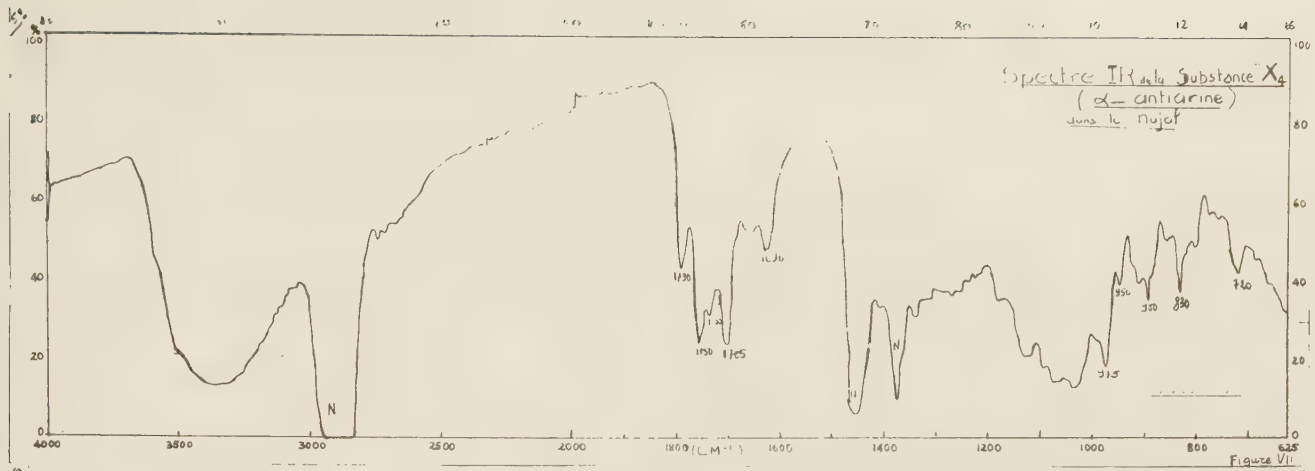


Figure VII

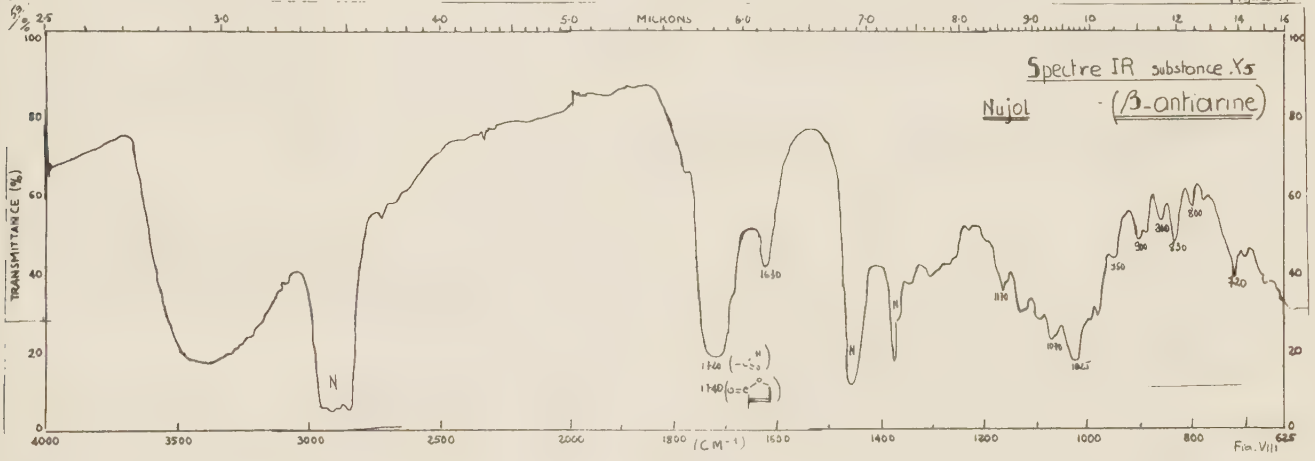


Fig. VIII

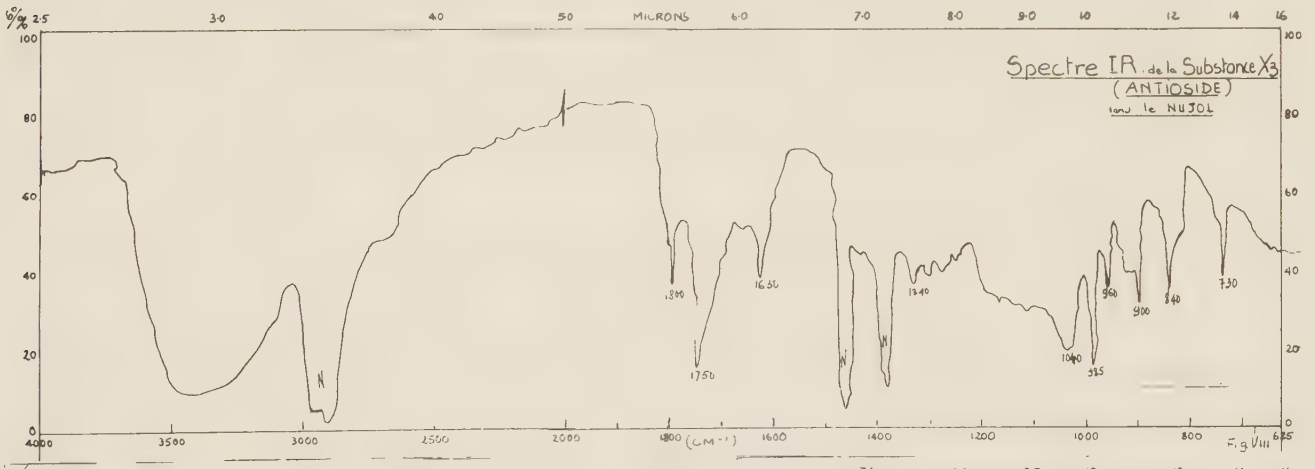


Fig. VIII

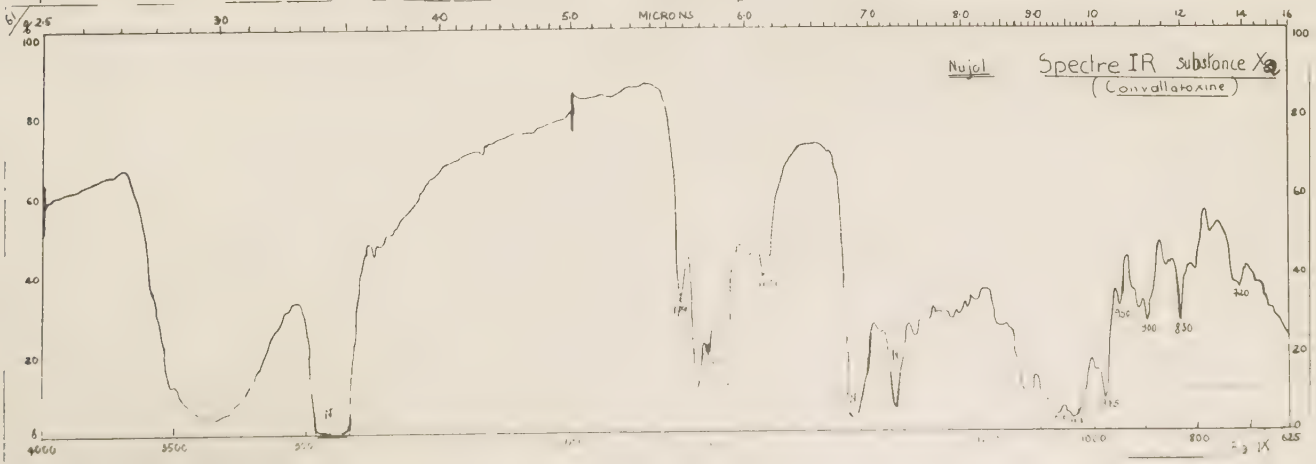


Fig. IX

6 - RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur un spectromètre "Varian A 60 A", fonctionnant sur 60 MHZ.

Nous avons utilisé comme solvant le méthanol dentérié (CD_3OD) additionné de 5 % de tétraméthylsilane (TMS).

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne (δ = o).

Le tableau XIV regroupe les principales caractéristiques des spectres de nos produits : (α-antiarine, β-antiarine, Antioside, Convallatoxine) reproduits (figures XI, XII, XIII).

Tous ces spectres sont en accord avec les structures proposées.

Mais étant donnée la similitude structurale de ces produits, les pics de résonance sont très proches les uns des autres dans les différents spectres. Ainsi nous ne notons aucune différence entre les spectres de l'α-antiarine et de la β-antiarine.

Dans tous les cas, on remarque en particulier le signal des 3 protons du méthyl en 18 sous forme de singulet entre 0,80 et 0,90 ppm. Nous constatons cependant une différence notable entre le spectre de l'antioside et les spectres des autres hétérosides.

Il se distingue en effet par l'absence du groupement aldéhydique en 19, remplacé par un méthyl. Ceci se traduit :

- d'une part par la disparition du signal du proton de la fonction aldéhydique (δ = 10 ppm) ;
- d'autre part par l'apparition d'un signal dû aux 3 protons du méthyl en 19 (δ = 0,95) très proche de celui du méthyl en 18 (δ = 0,80).

Nous avons également déterminé le spectre RMN de la génine issue de l'hydrolyse de la Convallatoxine après acétylation (figure XIV): il est bien conforme à la structure de la strophantidine. Par ailleurs nous n'y observons plus les signaux correspondants aux protons des hydroxyles osidiques qui sont très gênants dans l'interprétation des spectres des hétérosides. Nous donnons également à titre indicatif (figures XV et XVI), les spectres RMN de l'ouabaïne et de la digitoxigénine, enregistrés dans les mêmes conditions.

Nota : - Nous notons dans tous les spectres des pics parasites :

- Multiplet entre 3.15 et 3.30 ppm.
- Singulet aux environs de 4.70 ppm.

Elles sont vraisemblablement dues à des phénomènes d'échanges isotopiques entre le deutéron (CD_3OD) et les protons hydroxylés du solvant, résultant d'un équilibre.

L'intégration de ces pics n'a d'ailleurs aucune commune mesure avec le nombre de protons qui existent dans nos produits.

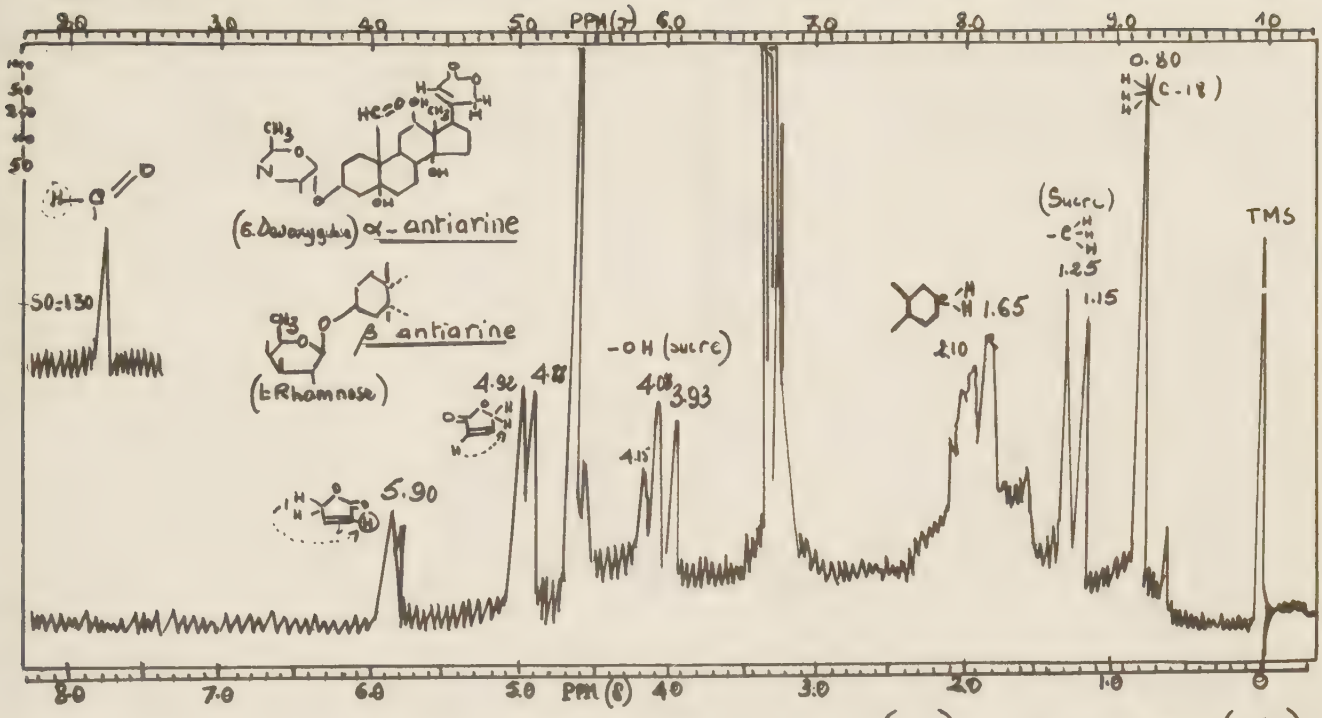
- Entre autres renseignements, la RMN nous apporte certaines précisions sur la structure des sucres :

1°) l'absence de signal dû à l'hydrogène aldéhydique du sucre, nous permet de conclure à une forme cyclique du sucre ;

2°) le nombre des signaux dus à l'hydrogène des fonctions alcooliques du sucre (3 singulets) nous permet de retenir la structure pyranique du sucre.

(Voir figures, pages suivantes).

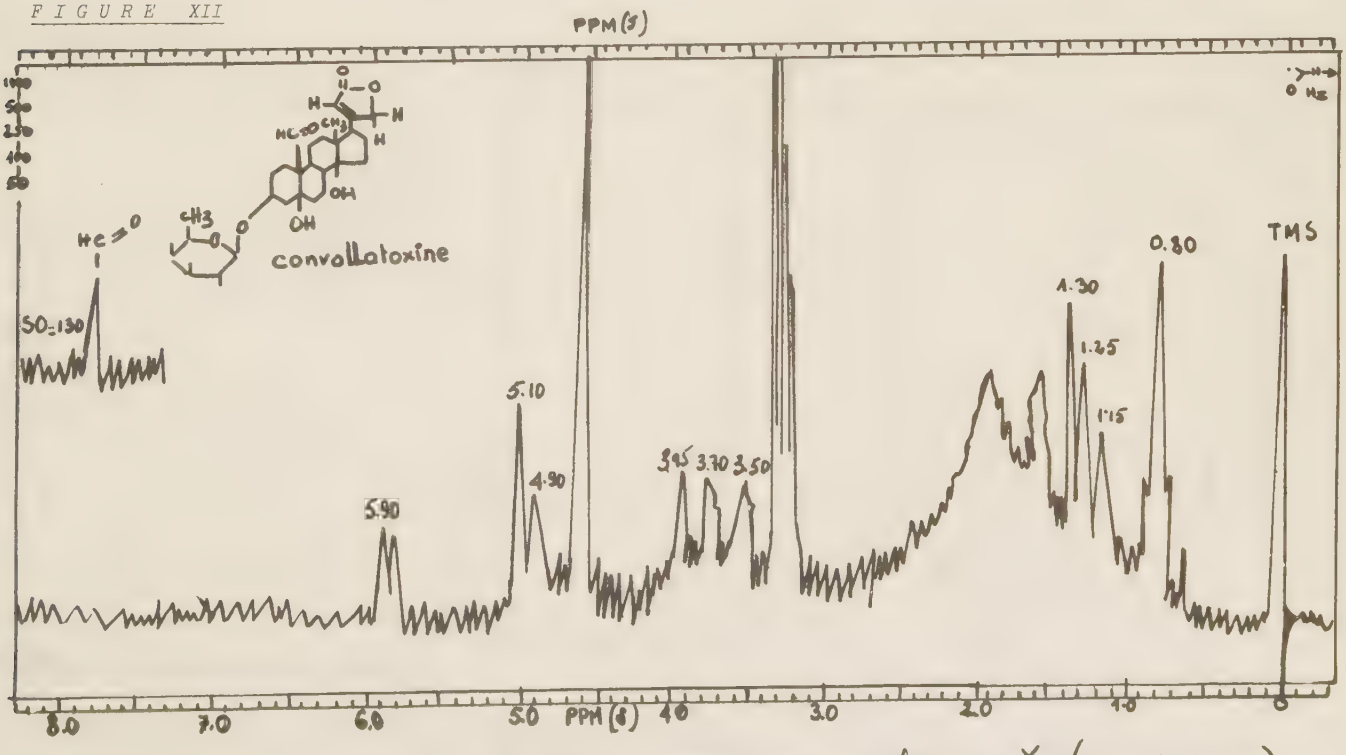
FIGURE XI



Spectre RMN α-antiarine (X_4) et β antiarine (X_5)

(CD_3OD)

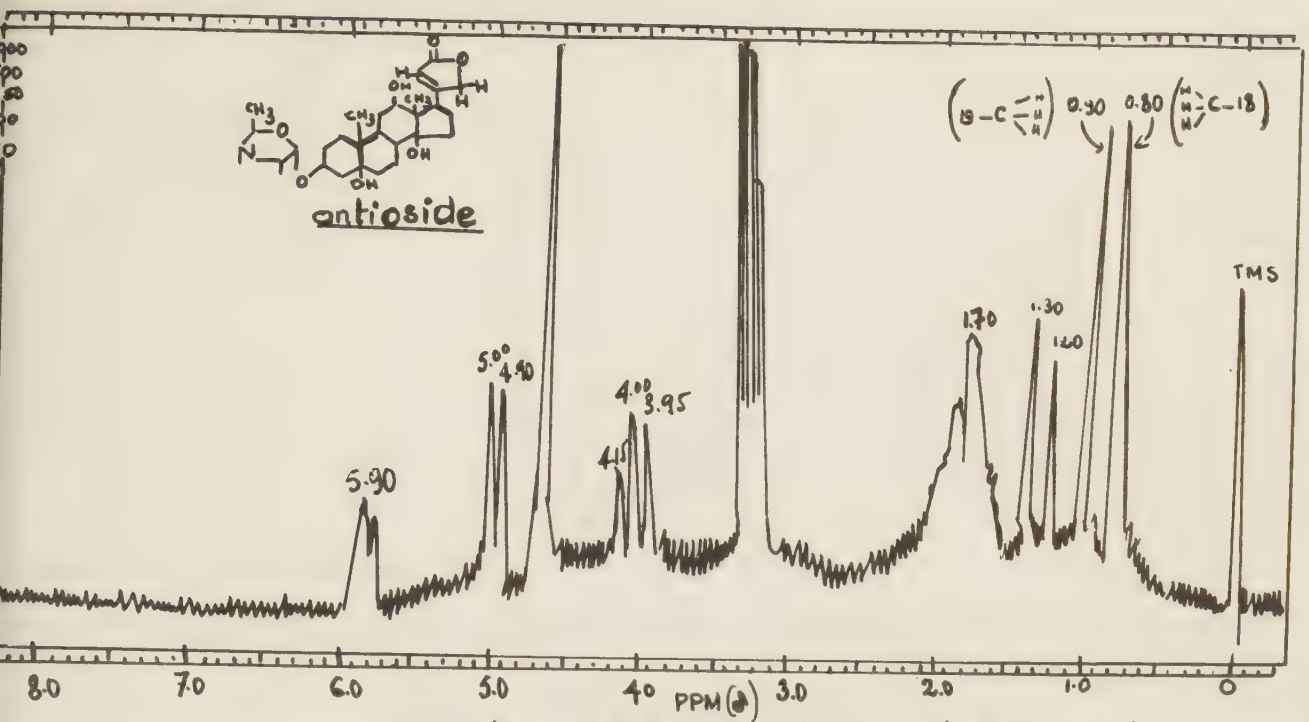
FIGURE XII



Spectre RMN de la substance X_2 (convallatoxine)

(CD_3OD)

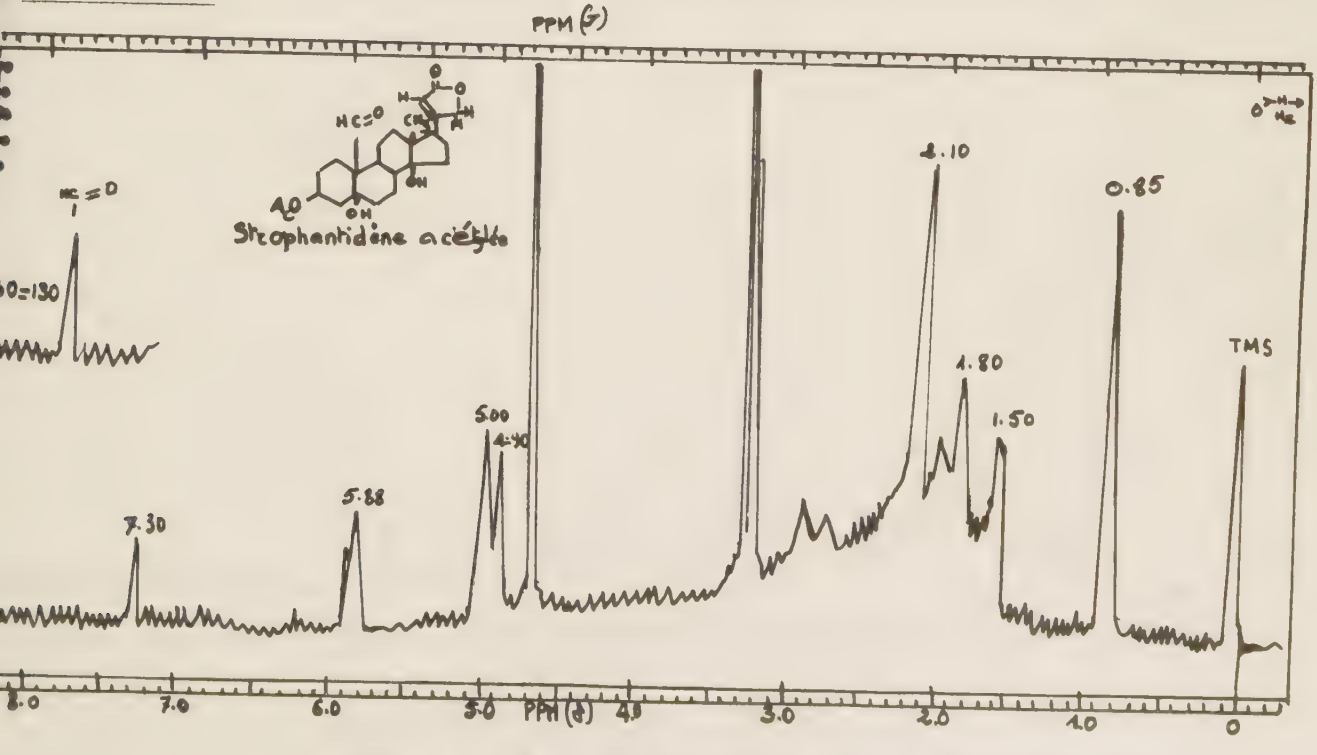
FIGURE XIII



Spectre RMN de l'antioside (substance X_3)

(CD_3OD)

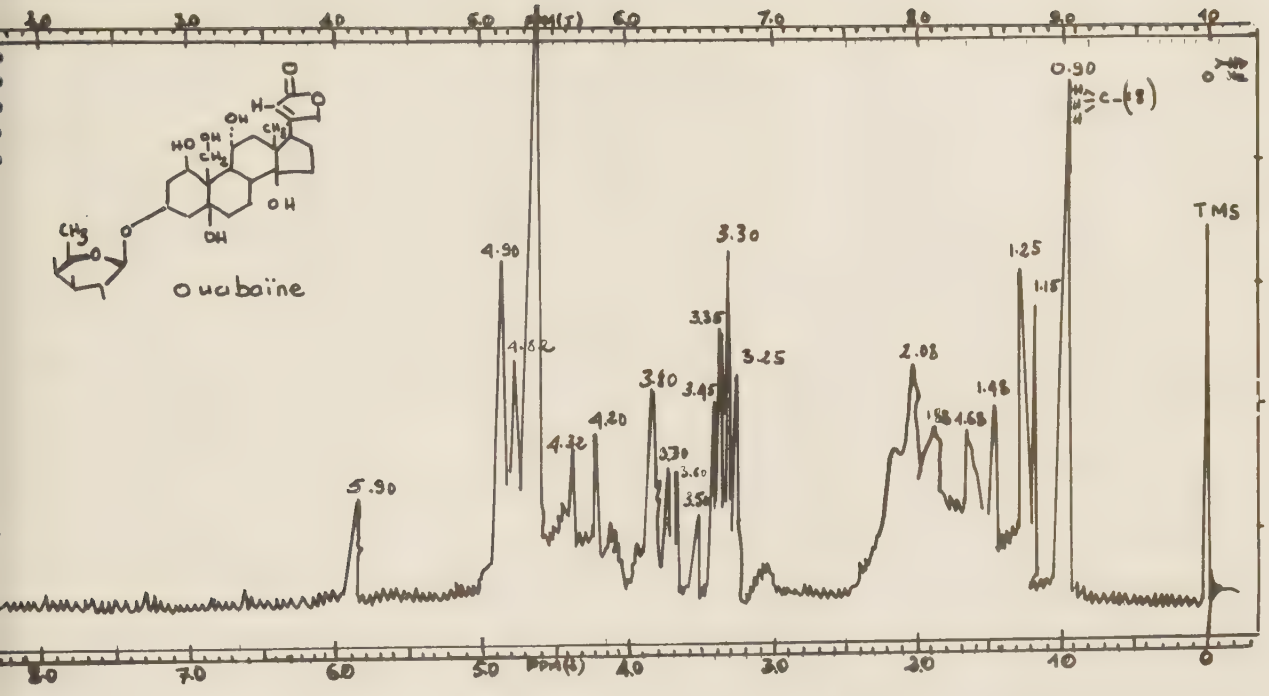
FIGURE XIV



Spectre RMN de la génine de X_2 (convallatoxine) acétylée

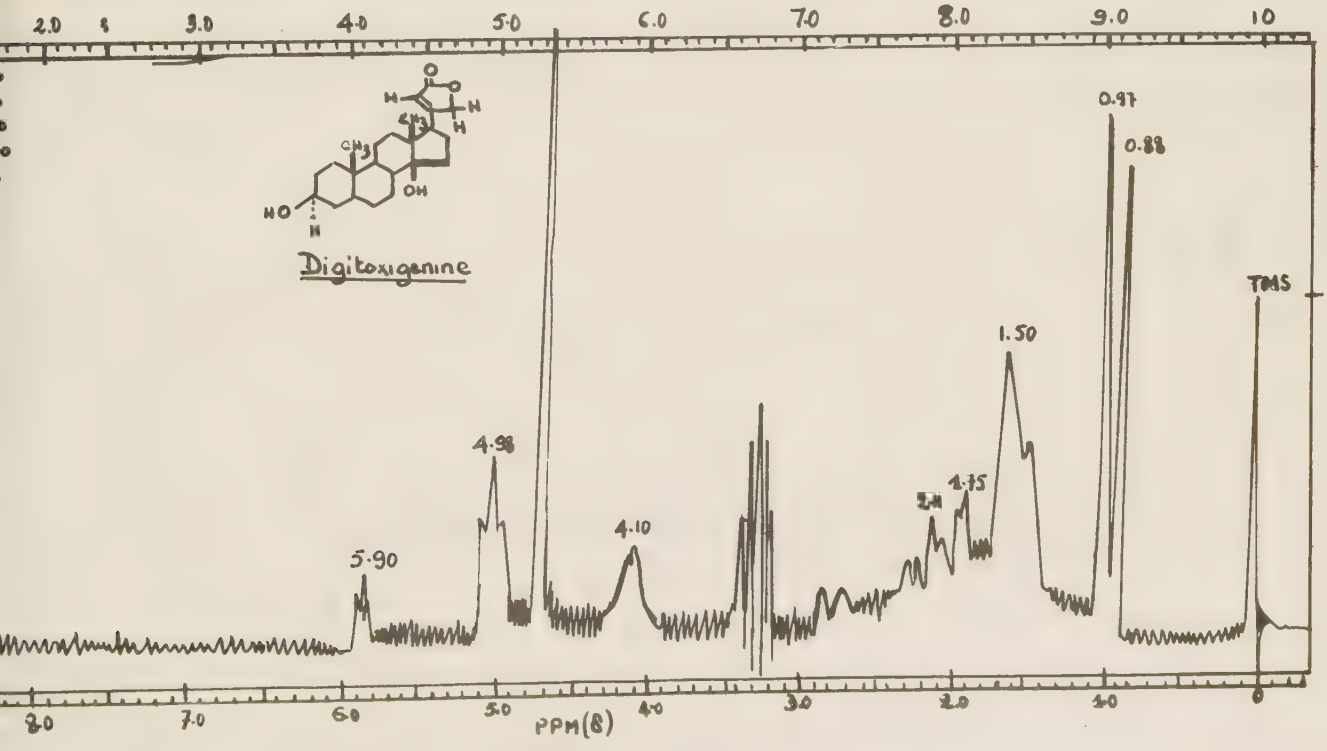
(CD_3OD)

FIGURE XV



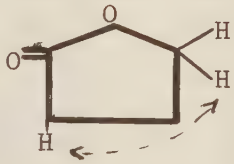
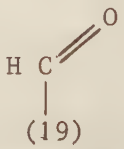
Spectre RMN de l'ouabaïne
(CD_3OD)

FIGURE XVI



Spectre RMN de la Digitoxigénine
(CD_3OD)

T A B L E A U XIV - Principales caractéristiques de RMN des substances isolées.

Déplacement chimique (δ : ppm)	*Multiplicité*	*Intégration*	*Attributions*	*Hétérosides*
0.80 - 0.90	1 singulet	3 protons	- 18	Tous les hétérosides
0.95	1 singulet	3 protons	- 19	Antioside
1.15 - 1.25	1 doublet	3 protons	- (sucre) Dédoublement attribué au couplage d'équilibre entre forme libre et forme cyclique	Tous les hétérosides
1.50 - 2.10	Multiplet en massif	16 protons	- (cycle stéroïde)	Tous les hétérosides
3.50 - 4.15	1 triplet	3 protons	H - O - (sucre cyclisé) sous forme pyranique	Tous les hétérosides
4.88 - 5.10	1 doublet	2 protons	 Couplage du - $C(H_2)$ avec - C(H) en β	Tous les hétérosides
5.80 - 5.90	1 doublet	1 proton	Couplage du - C(H) avec $C H_2$	Tous les hétérosides
10 ppm	1 singulet	1 proton	 (19)	- α-antiarine - β-antiarine - Convallatoxine

B - PROPRIETES CHIMIQUES

1 - REACTIONS COLOREES

Nous avons indiqué que les réactions effectuées avec $H_2 SO_4$ concentré et $H_2 SO_4$ à 84 % permettent l'identification de chaque hétéroside.

Les colorations obtenues avec nos substances figurent dans le tableau XV.

Hétérosides	$H_2 SO_4$ concentré			$H_2 SO_4$ à 84 %		
	1 mn	30 mn	1 h	1 mn	30 mn	1 h
α-antiarine				jaune	orangé	vert olive
β-antiarine	rouge	jaune brun	jaune brun	jaune	vert	vert olive
Antioside	vert	gris bleu	brun	incolore	bleu noir	orange
Convallatoxine	rouge	jaune gris	gris clair	orange	jaune citron	jaune orange

T A B L E A U XV

Les réactions de Kedde, de Raymond Marthoud et de Legal sont très nettement positives. Par contre la réaction de Keller-Kiliani et la réaction à l'acide thio-2-barbiturique sont négatives, ce qui laisse prévoir que les sucres ne sont pas des désoxy-2-oses.

2 - HYDROLYSE DES HETEROSIDES

En raison des faibles quantités de produits obtenus nous utilisons une microméthode dérivée de la méthode de Mamich-Siewert (54).

L'hydrolyse a été effectuée parallèlement sur les échantillons témoins.

a) Technique :

2 mg d'hétéroside sont chauffés dans un petit tube à essais avec 0,1 ml de mélange de Kiliani :

Acide acétique ..... 3 ml
Eau ..... 5,5 ml
Acide chlorhydrique concentré ..... 1 ml

La température est maintenue à 100°C pendant 1 heure. L'hydrolyse est donc réalisée dans des conditions énergiques.

Les solutions sont ensuite neutralisées par du carbonate de baryum et les filtrats évaporés à sec sous pression réduite. Les résidus sont repris par 2 ml d'eau. On porte à l'ébullition et laisse refroidir.

b) Etude chromatographique des génines (fig. XVII) :

Les génines sont extraites par agitation répétée (4 à 5 fois) avec 1 ml de mélange chloroforme-alcool (2:1). Les solutions sont déshydratées sur $Na_2 SO_4$ sec et évaporées à sec sous pression réduite.

Les résidus sont dissous dans 0,2 ml de méthanol et soumis à la chromatographie sur papier et sur couche mince de Kieselgel dans les conditions précédemment décrites.

Le tableau XIII rend compte des Rf obtenus. Ils permettent d'identifier les génines à celles provenant des hétérosides témoins :

- l'antiarégine à partir de l'α-antiarine (X_4) d'une part et de la β-antiarine (X_5) d'autre part ;
- l'antiogénine à partir de l'antioside (X_3) ;
- la strophantidine à partir de la Convallatoxine (X_2).

Nous n'avons pas pu préciser la nature de la génine de X_1.

c) Etude chromatographique des sucres (fig.XVIII) :

La phase aqueuse restant après extraction des génines est privée de chloroforme par concentration sous pression réduite jusqu'à consistance sirupeuse. On dilue avec quelques gouttes d'éthanol et la solution obtenue est examinée en chromatographie sur papier et sur couche mince.

Comme témoins nous disposions du L-rhamnose, du D-glucose et de D-gulométhylose, obtenu par hydrolyse de l'échantillon de α-antiarine.

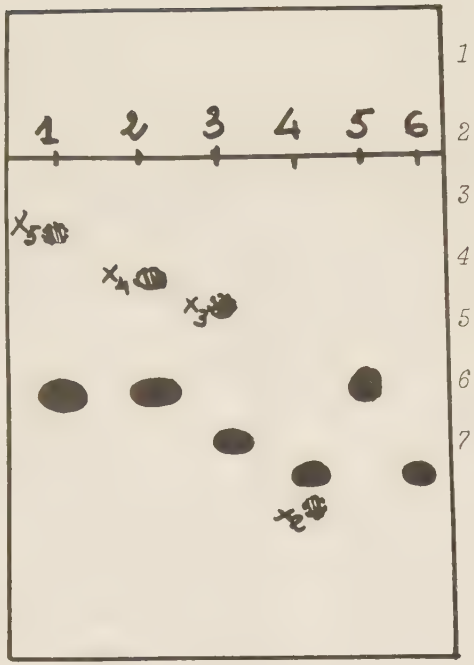
- *Dépôts :* 20 µl d'extrait,
  10 µl de témoins en solution aqueuse à 1 %.

- *Systèmes de solvants employés :*

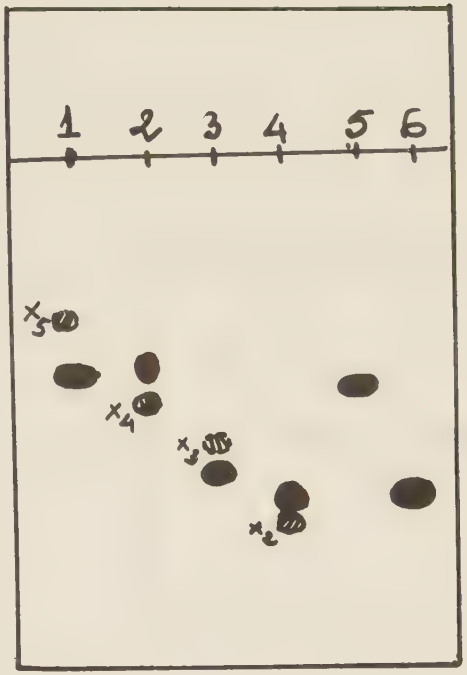
  - *Sur papier Whatmann n°1 en méthode descendante :*

SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE DES GENINES

A - Sur papier



1 = Extrait d'hydrolyse de X_5
2 = " " " " de X_4
3 = " " " " de X_3
4 = " " " " de X_2
5 = Antiarigénine
6 = Strophantidine
7 = Antiogénine



1 { Butanol-Toluène (50:50) saturé d'eau (15 h.)

2 { Méthyléthylcétone-Toluène (4:1) (24 h.)

B - Sur Kieselgel

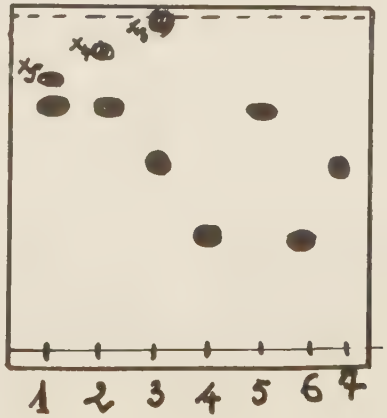
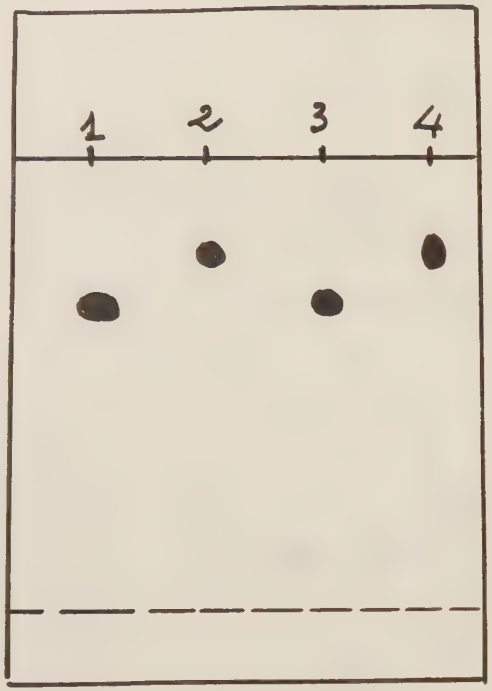


FIGURE XVII

SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE DES SUCRES

A - Sur papier :

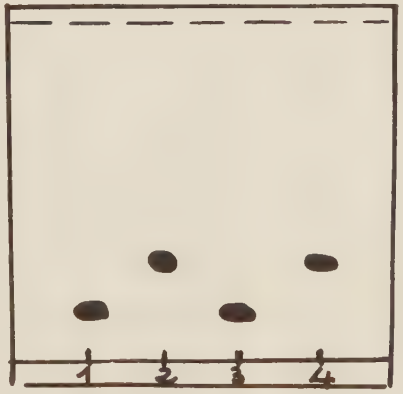
Solvant { Toluène-n-butanol (1:2)
saturé d'eau



B - Sur Kieselgel :

1 { Acétate d'éthyle.. 70
Isopropanol 15
Méthanol 15

2 { Acétate d'éthyle.. 12
Pyridine 5
Eau 4



1 = Extraits d'hydrolyse de X_3 (antioside) et X_4 (α-antiarine)

2 = " " " " " " X_2 (Convallatoxine) et X_5 (β-antiarine)

3 = D.gulométhylose

4 = L.Rhamnose

F I G U R E XVIII

1) Toluène-n butanol (1:2)/saturé d'eau ;

2) n butanol-éthanol-eau (4:1:5).

- *Sur couche mince de Kieselgel G.Merck :*

1)	Acétate d'éthyle	5
	Isopropanol	3
	Eau	1
2)	Acétate d'éthyle	12
	Pyridine	5
	Eau	4

- *Révélateur :* phtalate d'aniline :

Aniline	0,93 ml
Acide o-phtalique	1,66
n butanol saturé d'eau	100

Après pulvérisation les chromatogrammes sont placés à l'étuve à 100°C pendant 15 mn.

- *Résultats :*

. Pour la β-antiarine et la convallatoxine nous obtenons des taches de même Rf que le L.Rhamnose.

. Pour l'α-antiarine et l'antioside, les spots sont de même Rf que le D.gulométhylose témoin.

Les résultats de l'hydrolyse acide sont récapitulés dans le tableau XVI.

Hétérosides	*Génines*	*Sucres*
X_2 Convallatoxine	Strophantidine	L.Rhamnose
X_3 Antioside	Antiogénine	D.gulo-méthylose
X_4 α-antiarine	Antiarigénine	D.gulo-méthylose
X_5 β-antiarine	Antiarigénine	L.Rhamnose

T A B L E A U XVI

D - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES GENINES

Nous avons disposé de quantités suffisantes de X_5, X_3 et X_2, pour qu'il nous soit possible d'étudier les génines au point de vue physico-chimique.

1 - ANTIARIGENINE

300 mg de β-antiarine (X_5) sont dissous dans 30 ml environ d'acétone. On ajoute 0,5 ml d'Hcl 2 N. On laisse reposer dans un flacon hermétiquement clos à température ambiante pendant une semaine en agitant fréquemment. L'acétone est éliminé sous vide ; on ajoute 40 ml d'eau et 10 ml de méthanol.

La solution est portée au bain-marie bouillant à reflux pendant 30 mn.

Le méthanol est ensuite éliminé sous pression réduite ; la solution aqueuse est neutralisée par du carbonate de baryum.

Sur le filtrat la génine est extraite par agitations répétées avec une faible quantité du mélange chloroforme-alcool (3:1). Les solutions extractives sont réunies et déshydratées sur $Na_2 SO_4$.

Le filtrat est évaporé à sec à basse pression.

On obtient 280 mg de produit brut, dans lequel la chromatographie décèle des traces de β-antiarine. L'hydrolyse n'est donc pas totale.

- *Purification* :

L'extrait brut est chromatographié sur colonne de silice selon le procédé décrit au sujet de l'isolement des hétérosides.

Les fractions 8 à 12 éluées avec le mélange chloroforme-méthanol (95:5) ont fourni après évaporation 125 mg d'antiarigénine cristallisable en bâtonnets dans l'éthanol absolu.

- *Réactions colorées* :

Avec $H_2 SO_4$ concentré la coloration d'abord jaune, devient brun foncé au bout de 1 heure.

- *Constantes physiques* :

. F : 242 - 248°C.

. $(\alpha)_D^{20}$ dans le méthanol : + 43° ± 2.

. λmax UV en solution éthanolique : 220 et 300 nm.

Toutes ces propriétés correspondent à celles de l'antiarigénine.

2 - ANTIOGENINE

Elle est obtenue par hydrolyse de l'antioside dans les mêmes conditions.

A partir de 300 mg d'antioside (X_3) nous obtenons 130 mg de résidu brut, qui, après purification par chromatographie sur silice, ont donné 60 mg de substance dans les fractions éluées par les mélanges chloroforme-méthanol (96:4) et (93:7).

Cette substance, identifiée à l'antiogénine par chromatographie cristallise dans le mélange acétone-éther.

- F : 255 - 260°.
- $(\alpha)_D^{20}$ dans le méthanol : + 30 ± 2.
- λmax UV : 220 nm.

3 - STROPHANTIDINE

Nous obtenons dans les mêmes conditions à partir de 300 mg de convallatoxine, 120 mg de strophantidine pure.

- F : 140 - 145°.
- $(\alpha)_D^{20}$: + 46 ± 2.
- λmax UV : 220 et 300 nm.

Le spectre RMN de ce produit acétylé (figure XIII) correspond à celui d'un échantillon de strophantidine acétylé dans les mêmes conditions.

E - ETUDE DE QUELQUES DERIVES ACETYLES ET BENZOYLES DES HETEROSIDES ET DES GENINES

1 - TECHNIQUES

a) Acétylation :

200 mg de produit sont dissous dans un mélange de 2,5 ml de pyridine et 2,5 ml d'anhydride acétique. On laisse reposer pendant 24 h. à l'obscurité, à température ambiante. On évapore à sec ; le résidu est repris par une quantité suffisante de chloroforme, la solution est lavée avec quelques ml d'eau distillée, puis déshydratée sur $Na_2 SO_4$ sec.

On évapore à sec ; le résidu brut obtenu est purifié sur une colonne d'alumine et étudié en chromatographie sur papier et sur couche mince.

b) Benzoylation :

50 mg de substance sont dissous dans un mélange de 1 ml de pyridine, 0,50 ml de chlorure de benzoyle fraîchement distillé et 0,5 ml de méthanol.

La solution est placée au réfrigérateur pendant 4 h.

Le résidu d'évaporation est repris par le chloroforme, on lave à l'eau distillée. La solution chloroformique est ensuite évaporée à sec sous pression réduite après déshydratation sur $Na_2 SO_4$ sec.

Le résidu est purifié par passage sur colonne d'alumine.

c) Chromatographie sur colonne d'alumine :

Nous employons l'alumine Merck, à raison de 3 g pour 100 mg de substance.

L'élution est effectuée avec la série de solvants :

- benzène,
- benzène-chloroforme en proportions croissantes de chloroforme,
- chloroforme,
- chloroforme-méthanol en proportions croissantes en méthanol.

2 - RESULTATS

a) Acétate de β-antiarine :

A partir de 200 mg de β-antiarine nous obtenons 250 mg de résidu brut après acétylation. Par chromatographie sur papier avec le mélange solvant : benzène-chloroforme (9:1) saturé de formamide, on obtient 4 spots dont le plus intense présente un Rf : 0,60. Les quatre constituants se différencient probablement par leur degré d'acétylation. Le mélange a été purifié sur colonne d'alumine.

Nous parvenons ainsi à isoler 50 mg du constituant principal dans les fractions éluées par le mélange : benzène-chloroforme (50:50). D'après son Rf et son point de fusion (150-160°) il correspond vraisemblablement au tétra-acétate de β-antiarine, acétylé au niveau des hydroxyles en 12 pour l'antiarigénine et en 2 - 3 - 4 pour le L.Rhamnose, décrit par Dolder (23).

b) Benzoate de β-antiarine :

A partir de 50 mg de β-antiarine nous obtenons un résidu de benzoylation sirupeux qui après passage sur colonne d'alumine, recristallise en fines aiguilles à partir d'une solution acétonique additionnée d'éther.

. F : 290 - 295°.

. $(\alpha)_D^{20}$ dans l'acétone : + 81° ± 2.

Il s'agit probablement du tétrabenzoate.

c) Acétates d'α-antiarine :

Comme pour la β-antiarine, l'acétylation de l'α-antiarine aboutit à un mélange de dérivés Rf : 0,65 à 0,75.

Les essais de séparation sur colonne d'alumine sont restés infructueux.

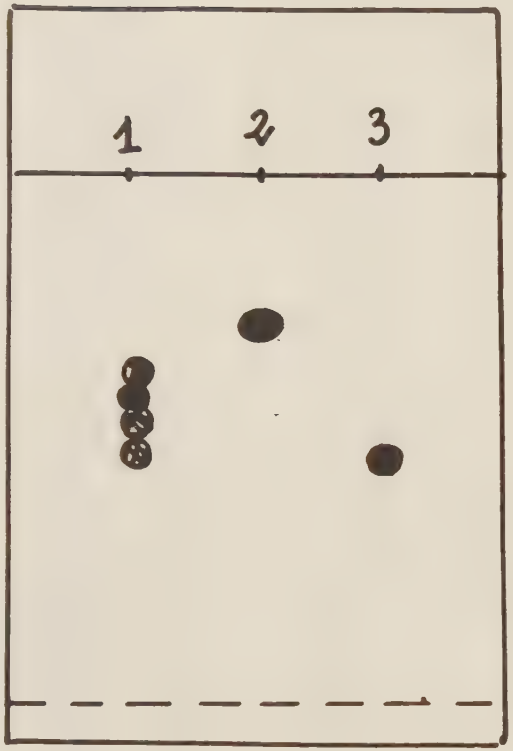
d) Benzoate d'α-antiarine :

Nous obtenons un résidu de benzoylation huileux. Après dissolution dans un mélange acétone-méthanol à chaud, il se dépose par refroidissement 90 mg de cristaux incolores en aiguilles.

. F : 245°.

. $(\alpha)_D^{20}$ dans l'acétone : + 3° ± 1.

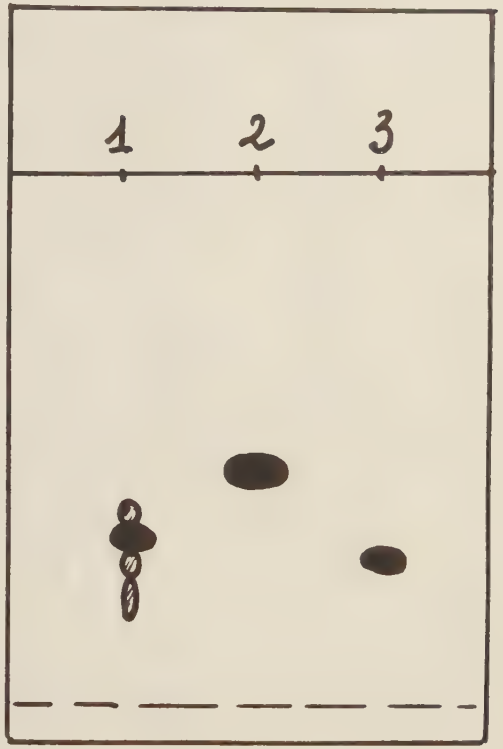
SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES DERIVES ACETYLES



1 = Acétates d'α-antiarine

2 = Acétate de β-antiarine

3 = Acétate d'antioside



Solvant 1 { Benzène/saturé de formamide

Solvant 2 { Benzène - chloroforme (9:1) saturé de formamide

F I G U R E XIX

D'après les indications de la littérature (22) il s'agit vraisemblablement du tétrabenzoate.

e) Acétate d'antioside :

L'acétylation de l'antioside donne un dérivé qui, examiné en chromatographie sur papier, présente un seul spot de Rf : 0,80. Il est cristallisé en aiguilles dans le mélange acétone-éther.

- F : 240°.
- $(\alpha)_D^{20}$ dans l'acétone : 2,5 ± 1.

Ces caractères se rapprochent de ceux du tétracétate d'antioside.

f) Benzoate d'antiarigénine :

A partir de 10 mg d'antiarigénine nous obtenons 16 mg de produit brut de benzoylation qui est purifié par passage sur colonne de silice et élution par le chloroforme.

- Rf : 0,55 dans le mélange solvant benzène-chloroforme (1:4).
- F : 265 - 270°.
- $(\alpha)_D^{20}$: + 35° ± 2 (dans l'acétone).

Les résultats indiqués concordent avec ceux rapportés par MARTIN et TRAMM (56) pour le dibenzoate d'antiarigénine, alors qu'ils sont éloignés de ceux indiqués par DOEBEL (22) et DOLDER (23) pour le monobenzoate.

C O M B R E T U M *glutinosum Perr ex D.C*

Synonymies :

- Combretum passargei Engl. et Diels
- Combretum leonense Engl. et Diels

Etude comparative avec le Combretum micranthum G. Don.

Synonymie :

Combretum altum D.C.

G E N E R A L I T E S

Si la constitution chimique du Combretum micranthum G. Don ou "Kinkéliba" vrai est assez bien connue et a fait l'objet d'un certain nombre de travaux (5 - 30 - 33 - 37 - 52 - 74 - 75 - 80 - 89 - 101), celle d'une espèce voisine à bien des égards : le Combretum glutinosum Perr, n'a pas été étudiée à notre connaissance, en ce qui concerne tout au moins les feuilles qui constituent la principale partie de la drogue utilisée en médecine populaire au Sénégal. A partir des données dont nous disposons sur le Combretum micranthum, il nous a paru intéressant de procéder à une étude comparative avec le Combretum glutinosum, en apportant par la même occasion certaines précisions sur la constitution chimique du premier.

Mises à part les analogies botaniques, ces deux espèces sont généralement prescrites pour les mêmes usages thérapeutiques en médecine traditionnelle et sont parfois confondues par les utilisateurs sous le même nom : "Kinkéliba".

Nous savons que le véritable kinkéliba fourni par le Combretum micranthum est inscrit à la pharmacopée française depuis 1937. Le Combretum glutinosum n'a pas bénéficié d'une diffusion analogue en Europe.

I - LES COMBRETACEES : LE GENRE COMBRETUM

Famille essentiellement tropicale et subtropicale, les combrétacées comptent de nombreux représentants au Sénégal.

Ce sont des plantes dialypétales, caliciflores, de l'ordre des Myrtales.

Cette famille comporte des arbres et des arbrisseaux dont certains sont lianescents.

Les feuilles sont simples, entières et sans stipules.

Les fleurs sont épigynes, groupées en cymes, en épis ou en grappes, tétramères ou pentamères.

L'androcée est diplostémone.

L'ovaire est infère, uniloculaire et renferme deux à douze ovules.

Les fruits sont indéhiscents, uniséminés et plus ou moins ailés.

La graine exalbuminée, renferme un embryon avec des cotylédons généralement enroulés.

Les divisions proposées dans cette famille divergent quelque peu selon l'élément de base choisi pour la classification par les différents auteurs. Elle repose le plus souvent soit sur la corolle (présence ou absence de pétales), soit sur l'androcée (nombre et forme des étamines), soit enfin sur la forme des cotylédons.

On rencontre au Sénégal sept genres de Combrétacées :

1 - Combretum.
2 - Quisqualis.
3 - Guiera.
4 - Anogeissus.
5 - Conocarpus.
5 - Terminalia.
7 - Laguncularia.

Le genre Combretum regroupe une vingtaine d'espèces, qui, selon la classification de Engler et Diels peuvent être distinguées par les caractéristiques suivantes :

- des feuilles opposées ou plus rarement alternes ;
- une corolle pentamère sauf quelques rares exceptions ;
- un calice tubuliforme ou en entonnoir et plus rarement en cloche avec un limbe caduc ;
- des filets staminaux droits.

Les combretum sont particulièrement abondants dans la région soudanienne où ils forment le fond arbustif des forêts sèches, mais on les rencontre partout au Sénégal et notamment en Casamance pour les espèces étudiées.

II - ENQUETES ETHNOBOTANIQUES SUR LE COMBRETUM GLUTINOSUM AU SENEGAL

- *Noms vernaculaires* :

. Wolof : "rat".
. Serère : "yay".
. Diola-socé-bambara : "diambakatan".
. Peul-Toucouleur : "doki".

A - HABITAT

C'est le combretum le plus répandu au Sénégal. On en rencontre depuis la région sahélienne jusqu'en Casamance sauf dans les zones salées maritimes.

B - EMPLOIS

Au cours de nos enquêtes ethnobotaniques nous avons été frappé de la grande utilisation du Combretum glutinosum dans la "Pharmacopée traditionnelle sénégalaise".

C'est le genre de "médicament miracle" connu de tous et signalé par la plupart des guérisseurs pour ses vertus thérapeutiques. Et si le véritable kinkéliba est en passe de devenir une banale infusion servant plutôt de breuvage que de médicament, par contre les nombreux utilisateurs de Combretum glutinosum ont encore une très haute opinion de l'activité médicinale de cette drogue dans diverses affections. Son astringence et son amertume plus prononcées que celles du Combretum micranthum expliqueraient peut-être cette préférence.

La grande considération dans laquelle elle est tenue, se reflète même dans certains noms vernaculaires. Ainsi :

- le nom sérère "yay" signifierait la "mère des médicaments" ;

- le nom socé "diambakatan" signifierait "la feuille qui ne déçoit pas".

En accord avec KERHARO (42) nous pensons que c'est l'une des drogues les plus prescrites en médecine traditionnelle sénégalaise et particulièrement appréciée par les ethnies Socé de la Casamance et des îles du Saloum.

L'organe le plus utilisé est la feuille dont on recommande particulièrement les jeunes pousses présentant une certaine fasciation, à l'état frais ou desséché au soleil. Sans trop exagérer on peut dire que chaque foyer sénégalais conserve son botillon de "rât" pour parer aux urgences.

On reconnait aux feuilles diverses propriétés : diurétique hépato-rénal, cholagogue, dépurative et fébrifuge. On les emploie sous forme d'infusé ou de décocté dans les affections urinaires (lithiases rénales, albuminurie), les oedèmes, les troubles hépato-biliaires, la fièvre bilieuse hématurique, le paludisme et les fièvres en général, l'anorexie, les toux, les bronchites et les céphalées.

Les autres organes sont plus rarement prescrits. Il faut signaler cependant :

- l'utilisation des écorces,de racines et du tronc comme anthelmintique et aphrodisiaque ;
- l'utilisation sur les chancres syphilitiques et les plaies des fruits immatures séchés et pilés.

Quant aux associations avec d'autres drogues actives, elles sont si nombreuses et si diverses qu'on ne pourrait les rapporter dans le cadre de ce travail. En somme le Combretum glutinosum constitue la drogue typique des médecines traditionnelles africaines, sorte de panacée à usages multiples.

Si certaines des propriétés thérapeutiques qui lui sont attribuées nécessitent quelques réserves, d'autres par contre, telles les propriétés diurétiques et cholagogues ne font aucun doute.

A tel point que, fait assez singulier, dans le cas de cette drogue l'expérimentation clinique a précédé la connaissance chimique.

Cette expérimentation effectuée par le Dr BLATT (11) dans un grand centre hospitalier de Dakar avec le décocté acqueux des feuilles (5 feuilles pour un litre d'eau) peut être résumée par les conclusions suivantes :

1) Action diurétique :

Elle a été retrouvée dans 70 % des cas portant sur 40 observations, dont voici la plus intéressante :

- *Femme de 30 ans*, présentant une obésité discrète par surcharge alimentaire. Les fonctions rénales et hépatiques sont intégres et aucun trouble cardiaque n'a été observé.

  . TA : 12 - 6.
  . Pouls régulier : 78.

La dose quotidienne administrée est de 1,5 litre au maximum, à l'exclusion de toute autre boisson. Les deux premiers jours la diurèse est passée de 0,750 l à 2,500 l, avec une perte de poids de 1,650 kg par jour en régime hypocalorique. Les deux jours suivants, le volume des urines émises n'est plus que de 1,200 l et la perte de poids de 500g.

Une seconde cure de quatre jours après dix jours d'arrêt donne les mêmes résultats avec une perte de poids moins sensible.

2) *Hypotenseur d'appoint* :

L'expérimentation portait sur 9 observations qui concernaient des sujets jeunes présentant des hypertensions récentes et peu élevées.

La traitement par le décocté, associé à un régime désodé à l'exclusion de toute autre médication hypotensive, a également donné des résultats intéressants :

- *Homme de 28 ans :*

Hypertension : 15,5 - 7.

Après 3 jours de traitement (2 1 le premier jour et 1 1 les jours suivants), la tension artérielle est tombée à 14 - 6,5.

Le traitement a été poursuivi avec une parfaite tolérance.

Nota : Cette action hypotensive est exprimée dans le langage imagé populaire en disant que : "la drogue diminue (sous-entendu : les forces) par suite d'une longue utilisation".

3) *Lithiase rénale* :

- *Homme de 31 ans*, ayant subi une vagotomie sélective pour ulcus bulbaire, avec des urines très irrégulières mais n'ayant jamais présenté d'affection de l'appareil urinaire.

A la suite de la cure, il émet spontanément un calcul de la taille d'un demi-grain de blé. L'émission est indolore, entraînant seulement une petite hémorragie qui cesse aussitôt.

Dans les jours qui suivent deux autres calculs sont éliminés de la même façon.

4) *Hépatite* :

Il s'agit dans ce cas d'un traitement par une préparation composée selon une formule traditionnelle associant :

- le Combretum glutinosum,
- le Tinospora bakis,
- le Carica papaya,
- des protéines animales (poulet).

- *Femme de 22 ans*, atteinte d'un ictère par hépatite avec des taux de transaminases élevés :

. SGOT : 250 U.
. SGPT : 220 U.

Elle présentait également des sels et pigments biliaires dans les urines.

L'ictère disparaît après le 6ème jour de traitement et le 17ème jour les transaminases sont baissées :

. SGOT : 45 U.
. SGPT : 34 U.

Leur taux devient normal deux mois plus tard.

Ces résultats cliniques nous paraissent assez éloquents pour plaider en faveur de certaines thérapeutiques traditionnelles. L'empirisme dans ce domaine, découle généralement d'une longue expérience de leur efficacité.

C'est donc à juste titre que le Combretum glutinosum a suscité notre intérêt.

III - MATERIEL D'ETUDE - CONDITIONS DE RECOLTE ET DE CONSERVATION DE LA DROGUE

Les normes d'utilisation locale des drogues étudiées, nous ont incité à réaliser un échantillonnage en particulier pour le Combretum glutinosum qui nous intéresse plus spécialement.

Tous nos échantillons proviennent du Sénégal.

A - COMBRETUM GLUTINOSUM

1) Les feuilles :

a) Echantillon n°1 :

Récoltées dans les jachères de mil et d'arachides, des environs de Sédhiou en Casamance.

Nous avons prélevé à la fois des feuilles âgées et des feuilles jeunes bourgeonnant sur des souches arbustives. Elles ont été débarrassées entièrement des tiges et exposées en couches minces au soleil sans précautions spéciales. Ce mode de récolte est conforme aux conditions locales d'utilisation de la drogue.

- Quelques tiges et feuilles fraîches ont été conservées dans l'éthanol pour l'étude anatomique.

b) Echantillon n°2 :

Récoltées dans les mêmes lieux et à la même période mais la dessication a été effectuée en étuve ventilée à 60°C.

c) Echantillon n°3 : stabilisé.

Récoltées sur la rouge de M'Bour à 10 km environ de Diamgniadio (région Sahélo-soudanienne).

- Une partie a été stabilisée dès le lendemain de la récolte par des vapeurs d'éthanol à 96°bouillant en vue de l'étude des flavonoïdes.
- Une autre partie conservée directement au "freezer" a été surtout utile pour l'étude des proanthocyanidols.

2) Les fruits :

Récoltés également dans la région de Sédhiou sur les mêmes pieds que les échantillons de feuilles n° 1 et n° 2.

B - COMBRETUM MICRANTHUM ("KINKELIBA")

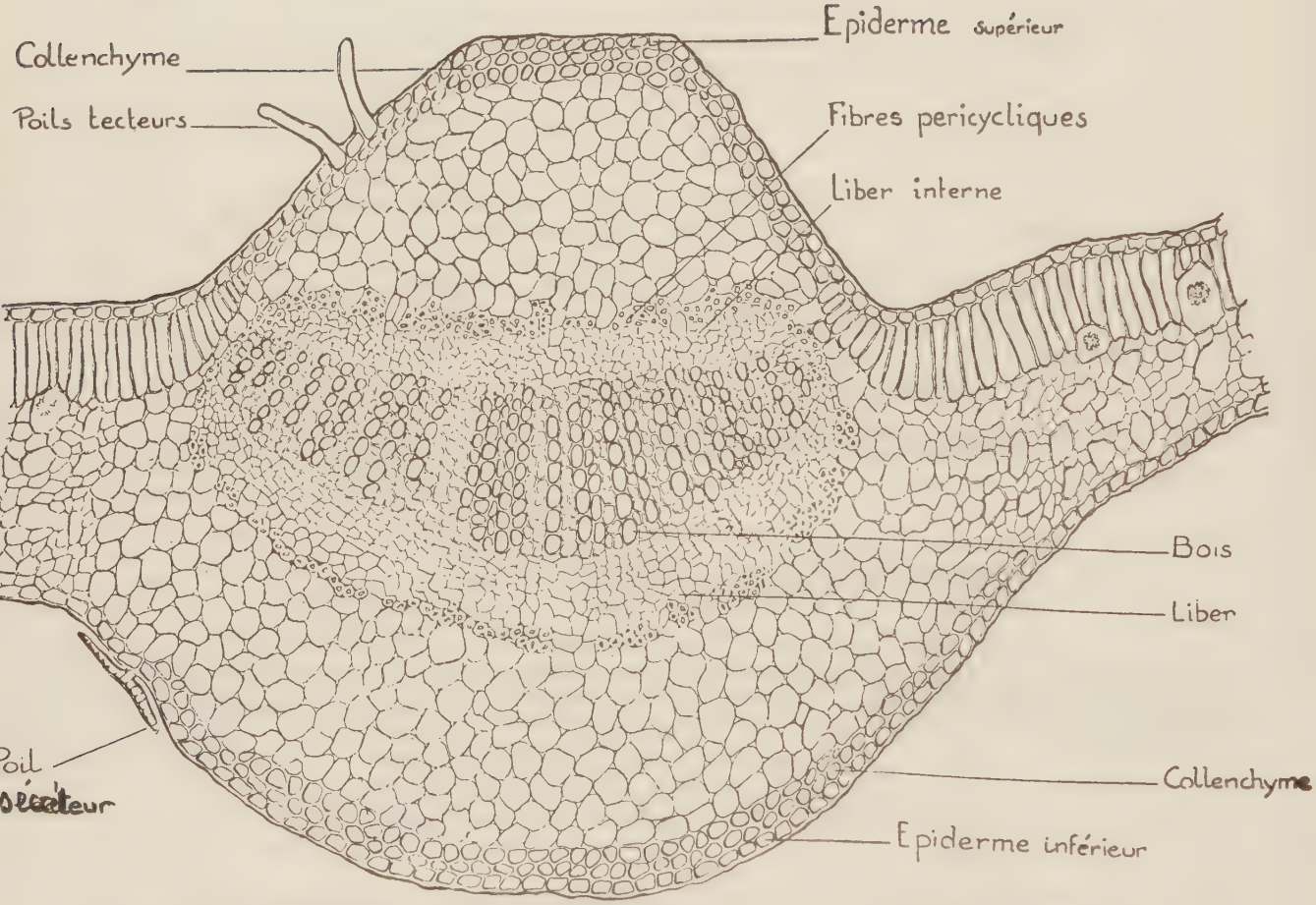
Les essais ont porté uniquement sur des feuilles groupées également en 3 lots récoltées dans les mêmes lieux et conservées dans les mêmes conditions que les échantillons correspondants du Combretum glutinosum.

IV - PLAN D'ETUDE

Après ces généralités notre étude portera sur les points suivants :

- Dans une première partie consacrée à l'étude botanique nous rapporterons nos travaux sur l'anatomie de la tige et des feuilles de Combretum glutinosum.
- Dans la deuxième partie nous ferons le point sur la constitution chimique connue du Combretum micranthum.
- Cette constitution nous servira de fil conducteur pour l'étude chimique comparative du Combretum glutinosum et du Combretum micranthum dont les résultats seront exposés dans la troisième partie.

FIGURE XX



FEUILLE DE COMBRETUM MICRANTHUM (Don.) d'après Mlle M.-T. FRANÇOIS

Première Partie

E T U D E B O T A N I Q U E

I - RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

La structure anatomique de la feuille du Combretum micranthum (figure XX) a fait l'objet d'un certain nombre d'études (24 - 30 - 51 - 73). PARIS (73) en donne la description suivante :

- un tissu criblé périmédullaire,
- un anneau de fibres péricycliques,
- de nombreuses mâcles,
- des poils tecteurs unicellulaires localisés sous l'épiderme supérieur de la nervure médiane,
- des poils sécréteurs en rosace à pied uni- ou pluri-cellulaire et à tête pluricellulaire.

Il note par ailleurs que les feuilles du Combretum glutinosum s'en distinguent par la présence de cryptes pilifères et stomatifères sous l'épiderme inférieur, et par la forme, la répartition, la quantité de poils tecteurs et sécréteurs.

Ces particularités ajoutées aux caractères morphologiques permettraient de distinguer les deux espèces.

On trouvera une description plus détaillée de l'anatomie de la feuille de Combretum micranthum dans la pharmacopée française (1972, IXe édition - I - 363-364).

Dans une étude anatomique et pharmacologique des Combrétacées en général, LEFEVRE (51) nous donne quelques indications concernant l'anatomie de la tige et de la feuille du Combretum glutinosum :

Tige :

- Le bois possède des îlots de liber mou interne.

- Un liber périmédullaire formé de parenchyme et de tissu criblé mou et renfermant en outre des mâcles d'oxalate de calcium et des fibres en quantité variable.

Feuille :

- Un limbe à structure bifaciale.

- Une seule assise de cellules dans le parenchyme palissadique.

- Une structure bicollatérale de la nervure correspondant à celle de la tige.

- Un système conducteur généralement entouré d'un arc ou d'un anneau complet de sclérenchyme ou bien seulement de fibres scléreuses qui peuvent être absents dans certains échantillons.

II - TRAVAUX PERSONNELS : ETUDE MORPHOLOGIQUE ET ANATOMIQUE DE LA TIGE ET DES FEUILLES DU COMBRETUM GLUTINOSUM

Nous avons cru utile de réactualiser ces données en y apportant quelques précisions.

A - DESCRIPTION (42)

Le Combretum glutinosum se présente sous forme d'un petit arbre de taille variable pouvant atteindre 10 m, à fût rarement droit, à écorce rugueuse, claire,à cîme ovoïde.

Mais le plus souvent on le rencontre sous forme d'arbuste à rameaux dressés provenant de souches ou de drageons dans les jachères de mil ou d'arachides où il forme de véritables taillis monospécifiques.

Les feuiles sont alternes, verticellées ou opposées, ovales, arrondies ou courtement acuminées au sommet, pubescentes entre les nervilles.

Le limbe est épais, coriace et poisseux, collant chez les jeunes feuilles, très profondément réticulé à la face inférieure.

Le pétiole est court.

Les fleurs sont en épis de couleur jaune pâle, très poilues.

Les fruits sont des akènes à quatre ailes, jaune paille à maturité, glabres, atteignant 4 cm de long sur 3 cm de large.

B - ANATOMIE DE LA TIGE (fig. XXI)

On y remarque :

- La présence d'un cortex peu développé.

- Un cercle presque continu de fibres péricycliques et intra-libériennes.

- Un pachyte continu avec un liber secondaire bien développé et un bois secondaire également très important.

- De nombreux amas de liber intraligneux.

- Un liber, circummédullaire.

- Une moelle sclérifiée.

- Des cellules sécrétrices à contenu amorphe dans la moelle et dans le liber externe de la tige et du pétiole.

C - ANATOMIE DE LA FEUILLE (fig. XXII)

1) La nervure :

Elle est très saillante à la face inférieure avec épiderme à cuticule festonnée.

On note la présence de deux faisceaux libéro-ligneux :

- le faisceau inférieur ou dorsal forme un arc volumineus s'ouvrant largement sur la face supérieure ;

- le faisceau supérieur ou ventral a une forme plane et ses bords rejoignent les extrémités du faisceau dorsal.

Le liber externe est entouré d'un péricycle fortement sclérenchymateux.

Faisant suite au bois, le liber circummédullaire continu, limite une moelle parenchymateuse réduite.

On remarque de nombreuses mâcles d'oxalate de calcium dans le liber externe et dans la zone médullaire centrale.

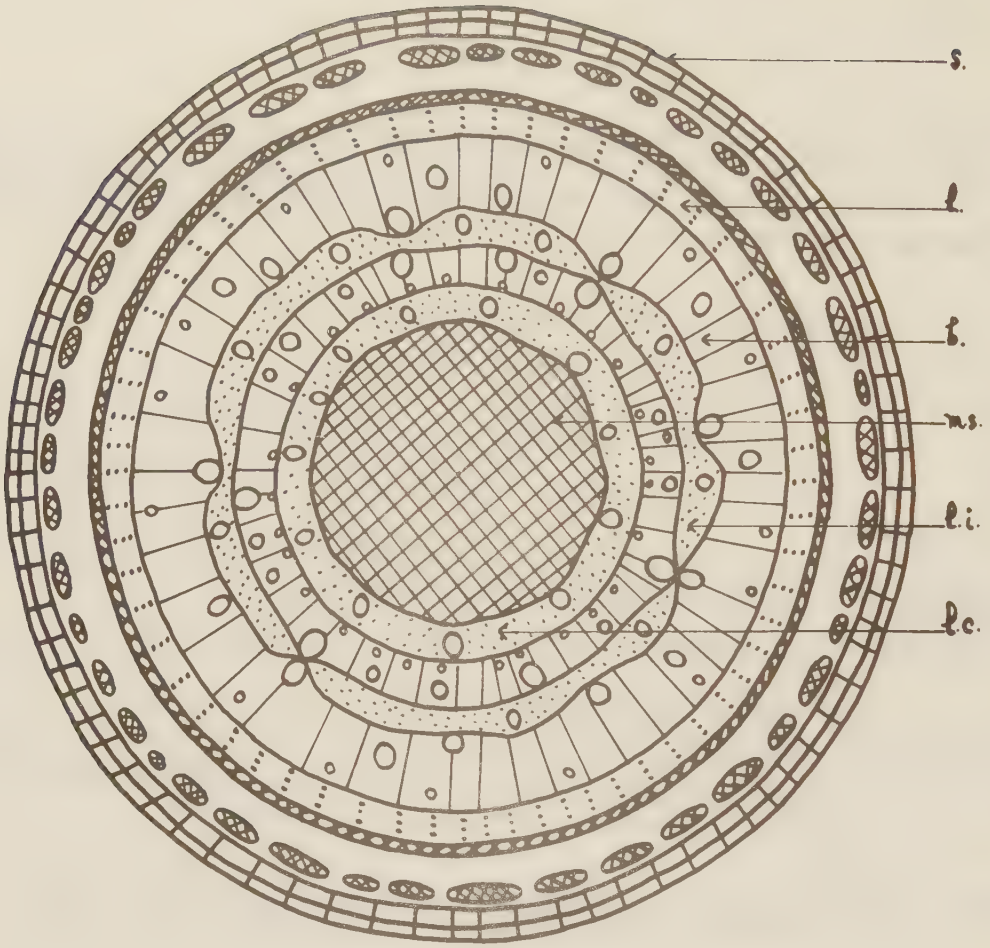


Fig. 21 - Tige de *Combretum glutinosum Perr*

S. : suber

ℓ. : liber

b. : bois

m.s.: moelle sclerifiée

ℓ.i.: liber intraligneux

ℓ.c.: liber circummedullaire

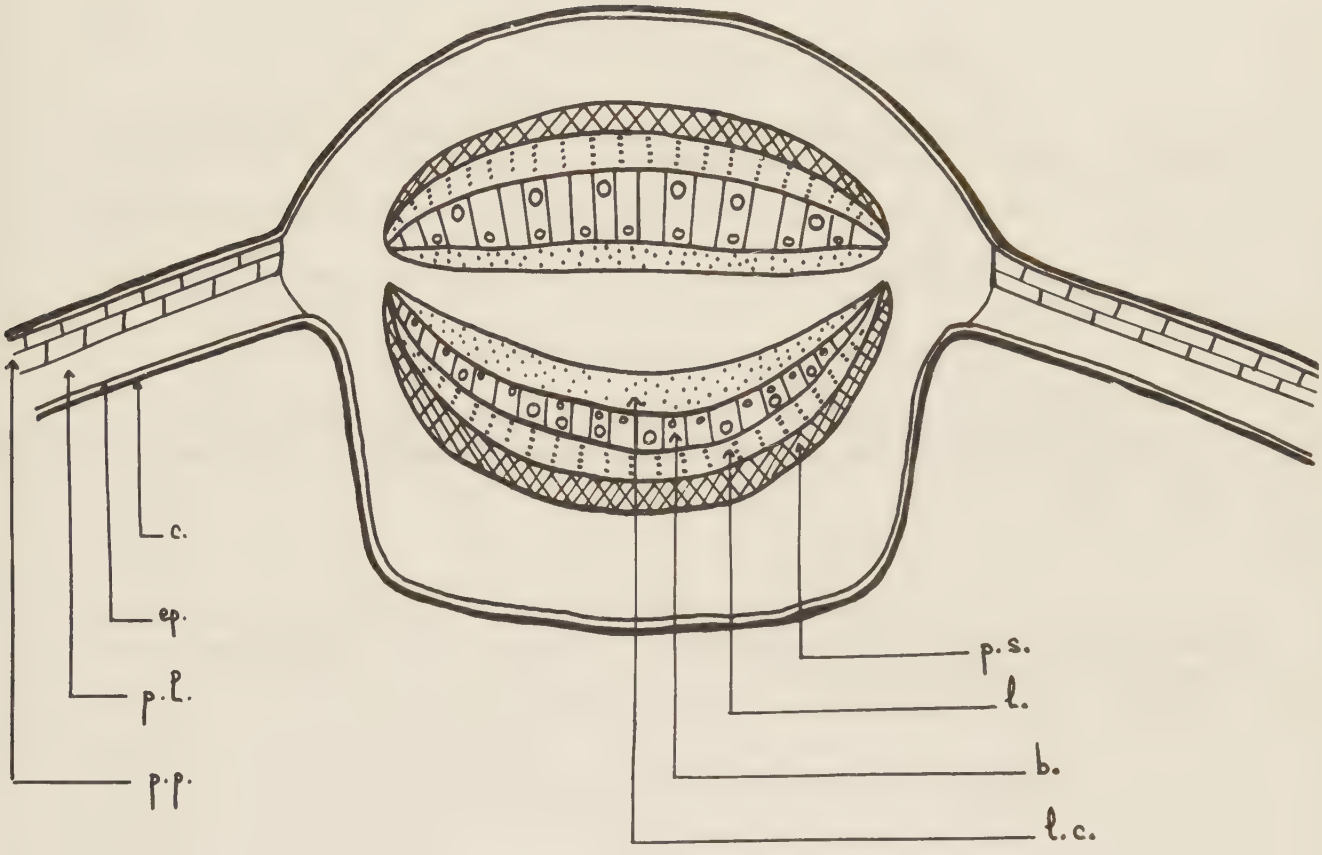


Fig. 22 - Feuille de *Combretum glutinosum Perr*

c. : cuticule

ep. : épiderme

p.ℓ. : parenchyme lacuneux

p.p. : parenchyme palissadique

p.s. : péricycle sclérifié

ℓ. : liber

b. : bois

ℓ.c. : liber circummedullaire

2) *Le limbe* :

- Du côté de la face supérieure,l'épiderme est formé de cellules allongées tangentiellement avec une mince cuticule.

- En dessous un hypoderme formé d'une assise de grandes cellules.

- L'épiderme inférieur est formé de cellules moins aplaties et plus grandes.

- La structure du parenchyme est bifaciale :

. une assise d'éléments palissadiques à la face supérieure ;

. un parenchyme lacuneux avec quelques mâcles d'oxalate de calcium à la face inférieure.

Cette étude comparée à celle de LEFEVRE (51) présente de nombreuses similitudes nous permettant de conclure à l'identité botanique des deux échantillons étudiés.

Deuxième Partie

RAPPEL DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DU COMBRETUM MICRANTHUM

Comme nous l'avons déjà signalé, de nombreux travaux sont relatifs au Combretum micranthum.

Déjà en 1891 HECKEL et SCHLAGDENHAUFFEN (33) signalaient la présence d'un tanin, d'un phlobaphène et de sel de nitre (nitrate de potassium).

PARIS (73 - 74) puis LEHMANN (52) isolèrent un tanin catéchique (combrétanin) et une catéchine (combretum catéchine).

LEHMANN signala également la présence d'un composé réducteur de nature alcaloïdique (combrétin).

BALANSARD et DELPHAUT (5) mirent en évidence une bétaïne et des acides organiques : malique, glycolique et glycérique.

GREGOIRE (30) décela la présence d'une substance hétérosidique (combrétoside) dont l'aglycone donnait les réactions des alcaloïdes.

Les travaux les plus récents sont dus à JENTZSCH et coll. (37) qui isolèrent des C. flavonoïdes : Vitexine et Saponarétine.

Nous savons que les C. flavonoïdes sont des hétérosides qui se distinguent par la difficulté de leur hydrolyse, s'expliquant par la liaison (C-C) du sucre et de la génine, d'où le nom de C-hétérosides, par opposition aux O-hétérosides normaux plus facilement dédoublables par les acides et les enzymes avec leur liaison semi-acétalique, où le sucre est relié par l'intermédiaire d'un hydroxyle de la génine.

Depuis l'isolement de la vitexine du Vitex littoralis, de nombreux autres C-flavonoïdes ont été mis en évidence dans les plantes. Les plus fréquents appartiennent au type flavone et peuvent être divisés en deux groupes (5 bis - 18 bis).

1 - *Dérivés de l'apigénine* (5-7-4' trihydroxyflavone) :

- Vitexine (8-C glucosyl apigénine).
- Saponarétine (6-C-glucosyl apigénine).
- Saponarine (saponarétine 7-O glucoside).
- Cytisoside.
- Vicénine.

2 - *Dérivés de la lutéoline* (5-7-3'-4' tétrahydroxyflavone) :

- Orientine.
- Homo-orientine.
- Scoparine.
- Lucénine.

La Vitexine et la Saponarétine isolées du Combretum micranthum sont donc des isomères :

- La vitexine étant la 8-C glucosyl apigénine.
- La saponarégine étant la 6-C glucosyl-apigénine.

Dans l'état actuel de nos connaissances la constitution chimique des feuilles du Combretum micranthum, est la suivante :

1 - Matière minérales : 4,80 %.

Chlorures, sulfates, phosphates et nitrates de calcium, magnésium, sodium et potassium.

2 - Acides organiques non phénoliques.

Acides malique, citrique, oxalique, tartrique, glycérique et glycolique.

3 - Acides phénoliques.

Acide gallique, libre et combiné.

4 - Ammoniums quaternaires.

Bétaïne et choline.

5 - Tanins catéchiques et catéchols.

6 - C-flavonoïdes.

Vitexine et Saponarétine.

POPP et coll. (80) ont également signalé dans les écorces du Combretum micranthum la présence de substances alcaloïdiques à propriétés antitumorales.

Troisième Partie

ETUDE CHIMIQUE COMPAREE
DU COMBRETUM GLUTINOSUM ET DU COMBRETUM MICRANTHUM

Contrairement au Combretum micranthum, le Combretum glutinosum n'a pas été étudié au point de vue chimique.

Les seules indications chimiques concernant cette espèce se rapportent aux graines dans lesquelles ANDERSON (4) a mis en évidence des gommes de nature uronique.

Nous décrirons d'abord nos essais préliminaires qui ont porté sur tous les échantillons de Combretum glutinosum et de combretum micranthum.

Nous procèderons ensuite à l'étude plus détaillée des constituants proanthocyaniques et flavoniques.

-:-

Chapitre I

ESSAIS PRELIMINAIRES

Au cours de nos essais préliminaires nous ne constatons aucune différence sensible entre les différents lots de feuilles d'une même espèce, conservée après dessication à l'abri de l'air et de l'humidité, sauf au sujet de la recherche des proanthocyanidols du Combretum glutinosum à laquelle nous consacrerons une mention spéciale.

A - TENEUR EN EAU

Déterminée sur 5 g de drogue pulvérisée, par perte de poids à la dessication en étuve à 100° ± 5° jusqu'à poids constant.

- Feuilles de Combretum glutinosum : 10,5 %
- Feuilles de Combretum micranthum : 11,4 %

B - TENEUR EN CENDRES TOTALES

Déterminée sur la poudre ayant servi au dosage de l'eau après incinération au four à moufle, dans une capsule en quartz, jusqu'à obtention de cendres blanches.

- Feuilles de Combretum glutinosum : 7 %
- Feuilles de Combretum micranthum : 5 %

C - TENEUR EN CENDRES SULFURIQUES

Déterminée selon la technique de la pharmacopée française - 1965 - VIIIe éd., p. 1537 :

- Feuilles de Combretum glutinosum : 8 %
- Feuilles de Combretum micranthum : 6,4 %.

D - RECHERCHES SUR L'INFUSE

1 - COMPOSES POLYPHENOLIQUES

- Les infusés à 10 % des feuilles et des fruits de Combretum glutinosum sont de couleur jaune et de saveur fortement astringente et amère ; ils présentent une fluorescence verdâtre, en lumière ultra-violette.

- L'infusé de feuilles de Combretum micranthum est coloré en brun jaunâtre, sa saveur est moins astringente que le Combretum glutinosum.

a) Recherches des tanins :

L'addition de quelques gouttes de solution aqueuse de chlorure ferrique à 1 p.100 provoque :

- une coloration bleu noirâtre avec l'infusé de feuilles et l'infusé de fruits du Combretum glutinosum ;
- une coloration brun verdâtre avec l'infusé de feuilles de Combretum micranthum.

Cette réaction de base ainsi que les réactions complémentaires groupées dans le tableau III nous permettent déjà de noter une certaine différence dans la fraction tanoïde des deux espèces :

- le Combretum glutinosum contient surtout des tanins galliques hydrolysables par les Acides dilués et les enzymes ;
- le Combretum micranthum contient surtout des tanins catéchiques dérivés des catéchols non hydrolysables, fournissant des dérivés de condensation (phlobaphènes) responsables de la couleur rouge brique de l'infusé de Kinkéliba exposé à l'air.

Cela confirme d'ailleurs nos connaissances sur le Combretum micranthum et explique pourquoi l'infusé ou le décocté du C. glutinosum est plus stable que celui du C. micranthum.

Par ailleurs nous ne constatons aucune différence entre les feuilles et les fruits du C. glutinosum.

Réactifs et technique	*C. glutinosum Feuilles*	*C. glutinosum Fruits*	*C. micranthum Feuilles*
Chlorure ferrique à 1%	Bleu noir intense (+++)	Bleu noir (++)	Brun verdâtre (+++)
Réactif de Stiasny R { Formol à 30% 2vol. Hcl concentré 1vol. 2 volumes d'infusé + 1 vol. de réactif au bain-marie à l'ébullition	Précipité rose très faible +	Néant	Précipité rose abondant (+++)
Chlorure ferrique + Acétate de Sodium Le filtrat issu de la réaction précédente est saturé d'acétate de sodium et additionné de quelques gouttes de $Fe\,cl_3$ à 1 %	Bleu noir intense (+++)	Bleu noir (++)	Bleu noir très faible (+)
Acide chlorhydrique concentré On ajoute 1 vol. de Hcl à 5 vol. d'infusé et on porte à l'ébullition	-Coloration rose pour les échantillons 1 et 2. -Néant pour l'échantillon n°3 stabilisé.	Néant	Rouge foncé intense.
Gélatine salée Solution de gélatine à 1 % dans une solution aqueuse de Nacl à 10 %	Précipité blanc jaunâtre (+++)	Précipité blanc jaunâtre (+++)	Précipité blanc jaunâtre (+++)
Filtrat précédent + Réactif de Stiasny	Néant	Néant	Précipité rose
INTERPRETATION	Présence d'une quantité importante de tanins galliques accompagnés de traces de tanins catéchiques. Absence de catéchines. La faible coloration rose des échantillons 1 et 2 pourrait être due aux proanthocyanidols.	Tanins galliques. Absence de tanins catéchiques et de catéchines.	Forte proportion de tanins catéchiques. Présence également de catéchine et peut-être de proanthocyanidols intensifiant la réaction avec Hcl.

T A B L E A U XVII

b) *Recherches des proanthocyanidols - Anthocyanidols et catéchols :*

La frontière entre les proanthocyanidols (encore appelés Anthocyanogènes ou Leucoanthocyanes) et les tanins (catéchiques en particulier) est restée très longtemps mal définie. On sait que le terme de "tanin" recouvre bien plus une réalité technologique qu'une entité chimique (64).

Le groupe des tanins catéchiques constituent en fait des substances polyphénoliques hautement polymérisés.

Depuis la mise en évidence du leucocyanidol dans le vin blanc par MASQUELIER (57) puis dans le vin rouge par RIBEREAU-GAYON (88) la connaissance de la nature des tanins catéchiques fit des progrès considérables.

Dans l'état actuel de nos connaissances, les proanthocyanidols et la catéchine paraîssent en effet constituer les unités élémentaires de ces tanins.

Pour la recherche des proanthocyanidols nous opérons selon la méthode préconisée par LABORDE (48) et mise au point par BATE-SMITH (6), consistant à transformer la structure flavanediol des proanthocyanidols (chromogènes) en anthocyanidols rouges correspondants, sous l'action d'un acide dilué à chaud et en présence d'oxygène.

La réaction est sensibilisée en présence de butanol ou d'alcool isoamylique qui absorbent la coloration rouge.

On opère avec le réactif suivant :

- Butanol ..... 4 vol.
- Hcl ..... 1 vol.

L'addition de 1 ml de ce réactif à 1 goutte d'infusé produit une intense coloration rouge à l'ébullition en présence de proanthocyanidols.

Combretum glutinosum				*Combretum micranthum*		
Feuilles			*Fruits*	*Feuilles*		
n° 1	*n° 2*	*n° 3*		*n° 1*	*n° 2*	*n° 3*
Faible (+)	Faible (+)	Néant (-)	Néant (-)	Rouge intense +++	Rouge intense +++	Rouge intense +++

T A B L E A U XVIII

- Pour tous les échantillons de feuilles de C. micranthum nous remarquons une intense coloration rouge prouvant la présence de proanthocyanidols, en quantité importante notamment dans l'échantillon frais stabilisé n°3.

- Dans le cas du C. micranthum, alors que les deux premiers échantillons donnent une réaction positive nettement plus faible que pour le C. micranthum, l'échantillon n°3 de feuilles stabilisées ainsi que les fruits ne semblent pas contenir de proanthocyanidols.

Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre consacré à l'étude des protanthocynidols.

c) *Recherche des flavonoïdes* :

Les flavonoïdes sont recherchés par la réaction de Shibata dite "réaction de la cyanidine" consistant à la réduction d'une flavone ou d'un flavanol par le magnésium en milieu acide et alcoolique fournissant une matière colorante de l'orangé au rouge selon la structure flavonoïde, dont on est parti.

La matière colorante obtenue n'est donc pas forcément le cyanidol comme dans la réaction précédente.

Réactif { Alcool éthylique 50° ..... 2 vol.
Hcl concentré ..... 1 vol.
Copeaux de magnésium.

On ajoute volume à volume l'infusé et l'alcool chlorhydrique en présence de quelques copeaux de magnésium. On ajoute sans mélanger quelques ml d'alcool isoamylique qui surnage.

Pour tous les échantillons étudiés, la teinte initiale (jaune pour le Combretum glutinosum et brun-jaunâtre pour le Combretum micranthum) vire progressivement à l'orangé dans l'alcool isoamylique.

Il y a donc des flavonoïdes dans le Combretum glutinosum (feuilles et fruits) et dans le Combretum micranthum (feuilles) et la teinte orangée semble indiquer qu'il s'agit de flavones.

Nota : Ne disposant plus de fruits de Combretum glutinosum les essais suivants n'ont été pratiqués que sur les feuilles.

d) *Recherche des Acides phénols libres* :

100 ml d'infusé sont épuisés à plusieurs reprises par de petites quantités d'éther ; les solutions éthérées sont évaporées à sec ; le résidu est repris par 2 ml d'éthanol à 96° et soumis à la chromatographie ascendante sur papier whatmann n°1 dans le mélange solvant de Partridge :

n butanol 4
Acide acétique 1
Eau 5

Nous opérons en présence de témoins d'acides gallique, ellagique, caféique, quinique, chlorogénique, ferulique, en solution méthanolique à 1 %.

- *Dépôts :* 20 µl pour les extraits,
5 µl pour les témoins.

Après séchage les chromatogrammes sont examinés en lumière de Wood et les acides phénoliques non fluorescents sont révélés par le chlorure ferrique à 2 % ou par le réactif de Swain (96) : paranitraniline diazotée.

- *Résultats :*

Tous nos échantillons de feuilles d'une même espèce ont une composition identique :

- *Combretum glutinosum :*

Nous observons 4 spots de même *Rf* que :

. l'acide ellagique ..... 0,40 bleu
. l'acide gallique ..... 0,65 bleu violet
. l'acide chlorogénique .... 0,70 bleu
. l'acide ferulique ..... 0,85 bleu.

- *Combretum micranthum :*

Nous n'observons que deux spots correspondants à :

. l'acide gallique,
. l'acide ferulique.

Ces essais ont été confirmés par une chromatographie bidimensionnelle sur papier whatmann 3 MM. dans les mélanges solvants suivants:

1ère Dimension :

Solvant de Partridge modifié par SMITH (95) et qui a l'avantage d'être d'emblée monophasique :

n butanol 60
Acide acétique 15
Eau 25

2ème Dimension : Acide acétique à 60 %.

6) Recherche des Acides phénols combinés :

L'infusé épuisé par l'éther est additionné d'un volume égal de H_2 SO_4 à 10 % et porté à l'ébullition pendant 5 mn. On laisse refroidir et on épuise de nouveau à l'éther. Le protocole est alors le même que précédemment.

Il apparaît pour le Combretum glutinosum un spot d'acide gallique.

Pour le Combretum micranthum : deux spots correspondant à l'acide gallique et à l'acide ferulique.

2 - ACIDES ORGANIQUES NON PHENOLIQUES

Nous opérons selon la technique rapide indiquée par RIBEREAU-GAYON (87) à partir de l'infusé, traité dans les mêmes conditions que pour la recherche des acides phénoliques libres.

Le résidu sec obtenu après évaporation des fractions éthérées, est repris par de l'éthanol à 50° et soumis à la chromatographie ascendante sur papier whatmann n°1 dans le mélange solvant :

- solution de Bleu de bromophénol 0,1 g p. 100 ml de n butanol,
- acide acétique au 1/2 ..... 40 ml.

Après migration et dessication à l'air, les acides organiques apparaîssent sous forme de taches jaunes sur le fond bleu du papier.

En présence de témoins nous avons pu ainsi déceler :

- pour le C. glutinosum : . 1'acide malique,
  . 1'acide citrique,
- pour le C. micranthum : . 1'acide malique,
  . 1'acide citrique,
  . 1'acide oxalique.

Mais les résultats obtenus sont variables en fonction de l'échantillon étudié et des méthodes employées. Il est possible qu'il existe d'autres acides non décelés.

En conclusion, la recherche des acides organiques phénoliques ou non dans les deux espèces de Combretum conduit à des résultats à peu près identiques, conformes aux données de la littérature sur le Combretum micranthum.

3 - RECHERCHE DES SAPONOSIDES : INDICE DE MOUSSE

Il a été déterminé selon la méthode de la pharmacopée française (1972 - IXe édition - II - 307).

- Nul pour le Combretum glutinosum il est supérieur à 1000 pour l'échantillon frais de Combretum micranthum. Il serait intéressant d'isoler les saponosides non signalés jusqu'à ce jour à notre connaissance. GREGOIRE (30) avait cependant noté un pouvoir aphrogène marqué qu'il n'attribua pas à la présence d'un saponoside.

E - RECHERCHES SUR LA POUDRE DE FEUILLES

1 - RECHERCHE DES ALCALOIDES

10 g de drogue sont additionnés de 5 ml d'ammoniaque dilué au 1/2 dans un flacon bouchant à l'émeri. On ajoute 50 ml d'un mélange éther-chloroforme (3:1). On bouche, on laisse macérer pendant 24 h. en agitant fréquemment. La phase organique est ensuite filtrée et épuisée dans une ampoule à décantation avec $H_2 SO_4$ à 5 %.

Dans les solutions acides réunies nous avons recherché les alcaloïdes par les réactifs de Dragendorff et de Valser-Mayer.

- La recherche est négative pour les deux espèces dans tous les échantillons soumis à l'analyse et l'étude chromatographique sur papier et sur couche mince de Kieselgel confirme ce résultat.

2 - RECHERCHE DES DERIVES QUINONIQUES

A 5 g de drogue pulvérisée on ajoute 5 ml de Hcl 1/10e. On laisse en contact pendant 2 h., puis on ajoute 50 ml de chloroforme. Le filtrat agité avec 10 ml d'ammoniaque dilué au 1/2 ne fournit aucune coloration.

Le Combretum glutinosum et le Combretum micranthum ne contiennent donc pas de dérivés quinoniques.

3 - RECHERCHE DES HETEROSIDES CYANOGENETIQUES

On introduit quelques grammes de drogue grossièrement pulvérisée dans un tube à essai avec une goutte de toluène.

Le tube est bouché avec du papier picrosodé maintenu par un bouchon de liège et placé à l'étuve à 37°C. Il ne se produit aucun changement de coloration même après 48 h. pour tous les échantillons étudiés.

4 - RECHERCHE DES STEROLS

Elle est effectuée sur une partie aliquote de l'extrait provenant de l'épuisement par l'éther de pétrole dans un appareil de Soxhlet. On évapore à sec et le résidu est repris par le chloroforme.

La réaction de Liebermann est négative. Les stérols sont donc absents dans les deux espèces, ou du moins ils n'existent pas en quantité suffisante décelable par le réactif de Liebermann.

En définitive, d'après les résultats obtenus au cours de ces essais préliminaires la composition chimique du Combretum glutinosum et celle du Combretum micranthum présentent de grandes analogies.

Par ailleurs il semble que le mode de conservation des feuilles n'influe pas sensiblement sur leur composition qualitative.

Les échantillons étudiés contiennent surtout :

- des tanins,
- des flavonoïdes,
- des acides organiques.

Dans les feuilles de Combretum micranthum nous avons décelé en outre des saponosides et surtout des proanthocyanidols. Cer derniers semblent exister également dans les feuilles non stabilisées du Combretum glutinosum (échantillons n°1 et n°2), alors qu'ils sont absents des feuilles stabilisées (échantillon n°3).

Cette observation, apparemment aberrante, nous a incité à une étude plus exhaustive des proanthocyanidols en vue de leur identification dans les deux espèces.

Nous avons également procédé à l'isolement et l'identification des principaux flavonoïdes du Combretum glutinosum en vue de les comparer à ceux du Combretum micranthum.

-:-

Chapitre II

ETUDE PARTICULIERE DES PROANTHOCYANIDOLS DU COMBRETUM MICRANTHUM

D'après les essais préliminaires, il n'est pas certain que le Combretum glutinosum contienne des proanthocyanidols, qui, par contre existent en quantité importante dans le Combretum micranthum si l'on en juge par l'intensité de la coloration rouge obtenue.

Or ces substances n'avaient pas encore été signalées dans les études se rapportant au Combretum micranthum, ce qui n'est d'ailleurs pas étonnant car leur connaissance n'a été possible qu'avec l'avènement relativement récent des techniques d'analyse de plus en plus fines notamment en chromatographie.

Les proanthocyanidols sont en effet très fragiles ; ils présentent une nette tendance à l'oxydation et à la condensation avec formation de tanins catéchiques. De plus ils sont dépourvus de propriétés physicochimiques spécifiques permettant leur étude sélective.

Nous avons vu cependant qu'une réaction permet d'atteindre indirectement leur structure par leur transformation, en milieu acide à chaud, en anthocyanidols homologues, instables eux aussi, mais dont la teinte rouge caractéristique se prête à la chromatographie et après élution à la colorimétrie.

Cette réaction très sensible est par ailleurs suffisamment spécifique et permet de différencier les proanthocyanidols des catéchines, qui fournissent dans les mêmes conditions, des précipités bruns dus à la formation de hauts polymères.

La transformation des proanthocyanidols en anthocyanidols ne prouve pas forcément que les premiers soient les précurseurs naturels des seconds, comme le laisserait supposer leur dénomination.

A - STRUCTURE

Avant d'aborder l'étude des proanthocyanidols de nos plantes il nous paraît utile de préciser les structures de ces substances (fig. XXIII).

Les proanthocyanidols monomères sont des flavanediols-3,4 alors que les catéchines sont des flavanols-3. On attribue généralement au moyau central pyranique une conformation dite en "demi-chaise" qui peut exister sous deux formes en équilibre (64).

L'introduction de groupements hydroxyles en C (3) et C (4) crée des centres d'asymétrie entrainant l'existence de stéréoisomères qui compliquent encore plus l'étude des proanthocyanidols.

La synthèse de certains monomères proanthocyaniques permet d'entrevoir plus clairement leur configuration.

Ainsi selon MICHAUD (67) le composé principal du leucocyanidol de synthèse, obtenu par réduction du taxifoliol (dihydroquercétol) (65 - 97), pourrait être le racénique de la configuration trans-2,3 trans-3,4. Les dérivés polyhydroxylés en C-(5), (7), (3'), (4'), tel le leucocyanidol, sont le plus fréquemment rencontrés à l'état naturel.

Mais d'autres composés, pour lesquels la répartition des hydroxyles phénoliques est différente ont pu également être isolés dans le règne végétal : leucodelphinidol, leucopélargonidol, etc...

Les proanthocyanidols peuvent donc être considérés comme l'ensemble des dérivés polyhydroxylés du flavane diol-3,4 qui ont la propriété de se transformer en pigments anthocyaniques en milieu acide à chaud.

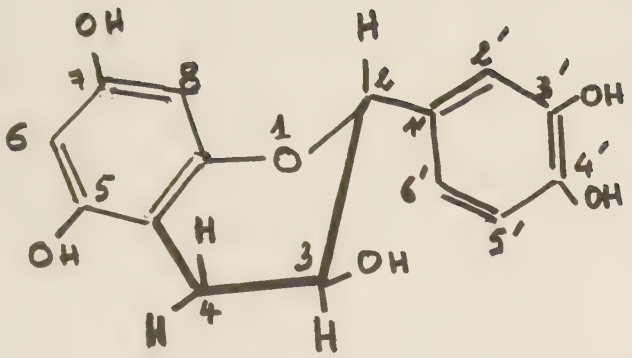
B - EXTRACTION

Nous procédons selon la technique mise au point par MASQUELIER (57 - 58) :

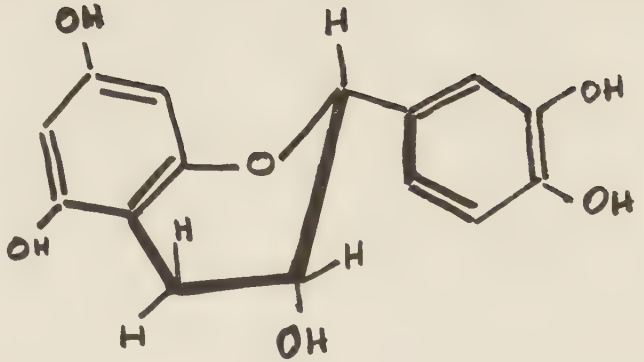
100 g de poudre de feuilles, fraîches ou sèches sont mises à macérer pendant quelques heures en agitant périodiquement, dans le mélange solvant acétone - eau (2:3).

L'extraction est renouvelée plusieurs fois jusqu'à ce que la réaction des proanthocyanidols, vérifiée sur une goutte de liqueur d'extraction, devienne négative.

Les solutés sont réunis et filtrés sur coton et ensuite sur papier de façon à obtenir un filtrat limpide. Celui-ci est concentré sous pression réduite à l'évaporateur rotatif pour éliminer au maximum l'acétone.



(+) - Catéchine



(-) - Épicatéchine

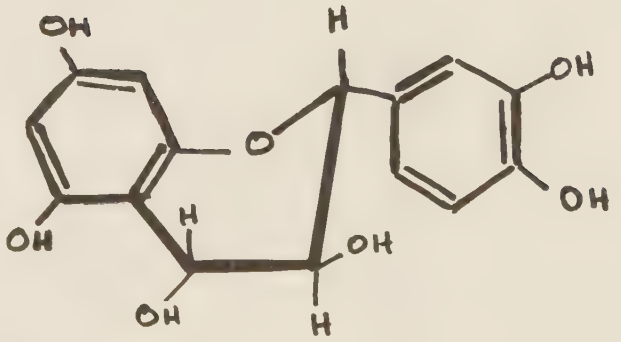


FIGURE XXIII

Procyanidol ("Leucocyanidol")

(2R 3S 4S - tétrahydroxy-5,7,3',4' flavenediol-3,4)

A l'extrait aqueux ainsi obtenu on ajoute du Na cl à saturation. La concentration saline étant modifiée, les hauts polymères de condensation des proanthocyanidols (tannoïdes catéchiques) précipitent de leur solution colloïdale. Par contre les substances faiblement condensées (des monomères aux trimères) restent en solution.

Après quelques heures de repos, on filtre soigneusement sur verre fritté.

Le filtrat est épuisé par agitation avec de l'acétate d'éthyle employé en petites quantités à plusieurs reprises.

Les solutés sont réunis et déshydratés sur du sulfate de sodium anhydre, filtrés et concentrés sous pression réduite à une température $\leq 50°C$.

L'extrait est versé dans une fiole contenant 5 volumes de chloroforme. Il se forme un précipité floconneux qu'on laisse reposer 15 à 20 mn, on filtre rapidement sur verre fritté en rinçant avec une petite quantité de chloroforme pour enlever le maximum d'acétate d'éthyle.

Le précipité recueilli est aussitôt placé dans un dessicateur sous vide phosphorique pendant une nuit.

Rendements en extrait brut :

- C. glutinosum frais ..... 0,5 %
- C. glutinosum sec ..... 0,2 %
- C. micranthum frais ..... 1,5 %
- C. micranthum sec ..... 0,75 %

Les extraits du C. micranthum se présentent sous forme de poudres amorphes blanc-ivoire, tandis que ceux du C. glutinosum ont une teinte jaune brunâtre.

1) *Extraits de C. micranthum :*

La réaction au butanol chlorhydrique à l'ébullition est franchement positive avec les deux extraits.

2) *Extraits de C. glutinosum :*

La réaction est négative avec les deux extraits.

La faible réaction positive obtenue dans les essais préliminaires résultait donc probablement de la présence de polymères dans l'extrait aqueux total des feuilles de glutinosum, qui ont été éliminés au cours de l'extraction des oligomères.

Par contre ces extraits de C. glutinosum se montrent particulièrement riches en flavonoïdes si on se réfère à l'intense coloration jaune orangée obtenue avec la réaction de la cyanidine.

Nous devons donc convenir de l'absence de proanthocyanidols dans les échantillons de Combretum glutinosum soumis à l'analyse, alors que ceux du Combretum micranthum en contiennent une quantité appréciable notamment dans l'échantillon frais stabilisé par conservation au "freezer".

C - *ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT PROANTHOCYANIQUE DE COMBRETUM MICRANTHUM (8 bis - 12 bis)*

1 - TECHNIQUE

Nous procédons par chromatographie bidimensionnelle sur papier et sur couche mince de cellulose, en présence de témoins de référence : + (-) catéchine et (-) - catéchine placés en marge des chromatogrammes.

a) Sur papier whatmann 3 MM (25 × 25 cm) :

Nous avons utilisé le couple de solvants :

- 1ère dimension :

B.A.W.	:	n-butanol	4
		Acide acétique	1
		eau	2,2

- 2ème dimension :

Ac OH 2 %	:	Acide acétique	2
		eau	98

Le front du solvant est mené à 20 cm dans chaque dimension.

b) Sur couche mince de cellulose :

Nous utilisons des plaques de cellulose Merck étalées sur feuilles d'aluminium et déjà prêtes à l'emploi sans activation.

Le front est mené à 15 cm dans chaque dimension avec les solvants suivants :

- *1ère dimension :*

Butanol secondaire - Acide acétique - Eau (14:1:5).

- *2ème dimension :*

Acide acétique - eau (6:94).

- *Dépôts :*

500 µg d'extraits et 25 µg de témoins en solution méthanolique.

- *Révélateur* : (réactif de Roux (90)).

Acide paratoluène sulfonique en solution éthanolique à 5 %. Après pulvérisation le chromatogramme est placé quelques minutes dans une étuve à 100°C. Les catéchines apparaissent en brun violacé et les proanthocyanidols en rose.

2 - RESULTATS

Les chromatogrammes obtenus (fig.XXIV) présentent un aspect caractéristique avec de nombreux spots ayant une disposition géométrique:

1°) Deux spots bien individualisés correspondant à des catéchines mais dont les Rf ne s'identifient pas à ceux de la (+) - catéchine et de la (-) - épicatéchine. La tache la plus importante, qui se présente sous une forme allongée en poire, correspondrait d'après les Rf à une gallocatéchine.

Rf	Sur papier	1ère dimension	: 0,40
		2ème dimension	: 0,27
	Sur couche mince de cellulose	1ère dimension	: 0,40
		2ème dimension	: 0,35

2°) Plusieurs taches colorées en rose correspondant aux proanthocyanidols à définition moins précise. Parmi ces oligomères, trois sont nettement bien individualisés dans une zone définie située en chromatographie sur couche mince entre les Rf :

- 0,46 à 0,73 en 1ère dimension,
- 0,26 à 0,33 en 2ème dimension.

3°) Il existe d'autres taches moins individualisées de teinte orangée qui correspondent probablement à des structures flavanoliques indéterminées.

4°) Enfin, 3 spots jaunes sous forme de traces. Il s'agit de dérivés flavoniques entrainés également par l'extraction des flavanes.

SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE DE L'EXTRAIT PROANTHOCYANIQUE OLIGOMERE DES FEUILLES DE COMBRETUM MICRANTHUM

C = (+) - catéchine

E = (-) - épicatéchine

= Catéchines

= Proanthocyanidols

= Flavones

= Substances indéterminées (probablement structures flavanoliques)

A - Sur papier Whatmann 3MM

I	n-butanol	4
	Acide acétique	1
	Eau	2,2
II	Acide acétique à 2 %	

B - Sur cellulose/sur feuillet d'aluminium

I	Butanol secondaire	14
	Acide acétique	1
	Eau	5
II	Acide acétique à 6 %	

FIGURE XXIV

D - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES ANTHOCYANIDOLS

L'action de l'acide chlorhydrique concentré à chaud provoque la transformation des oligomères proanthocyaniques en anthocyanidols correspondants dont la coloration rouge caractéristique suffit à les révéler sur les chromatogrammes.

Nous aboutissons à des résultats identiques en opérant soit à partir de l'extrait proanthycyanique soit directement à partir de la poudre de drogue totale.

1 - TECHNIQUE

Une partie aliquote de l'extrait proanthocyanique ou 20 g de poudre de feuilles de kinkéba sont mises en suspension dans H cl 2 N. On porte au bain-marie bouillant pendant 30 mn sous réfrigérant à reflux.

Il apparait une coloration rouge intense due aux aglycones anthocyaniques. On filtre après décantation.

Les anthocyanidols sont extraits de la liqueur acide refroidie par le minimum d'alcool iso-amylique. On évapore à sec ; le résidu est repris par du méthanol contenant 1 % de H Cl et soumis à la chromatographie en présence de témoins de cyanidol et de delphinidol :

a) *Chromatographie bidimensionnelle sur papier whatmann 3 MM:*

Nous avons utilisé le système de solvants :

- *1ère dimension :*

Mélange de Forestal : (Acide acétique - Acide chlorhydrique - Eau (30:3:10).

- *2ème dimension :*

n-butanol saturé de H cl 2 N.

b) *Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose :*

étalée sur des feuillets en polyester (Merck).

- *1ère dimension :*

Mélange de Forestal.

- *2ème dimension :*

Alcool amylique - Acide acétique - Eau (2:1:1).

2 - *RESULTATS*

L'examen des chromatogrammes ainsi obtenus (figure XXV) permet de caractériser très nettement :

a) *Le cyanidol :*

Rf { Sur papier { 1ère dimension : 0,55 ; 2ème dimension : 0,70
Rf { Sur couche mince de cellulose { 1ère dimension : 0,50 ; 2ème dimension : 0,45

b) *Le delphinidol :*

Rf { Sur papier { 1ère dimension : 0,30 ; 2ème dimension : 0,50
Rf { Sur couche mince de cellulose { 1ère dimension : 0,25 ; 2ème dimension : 0,20

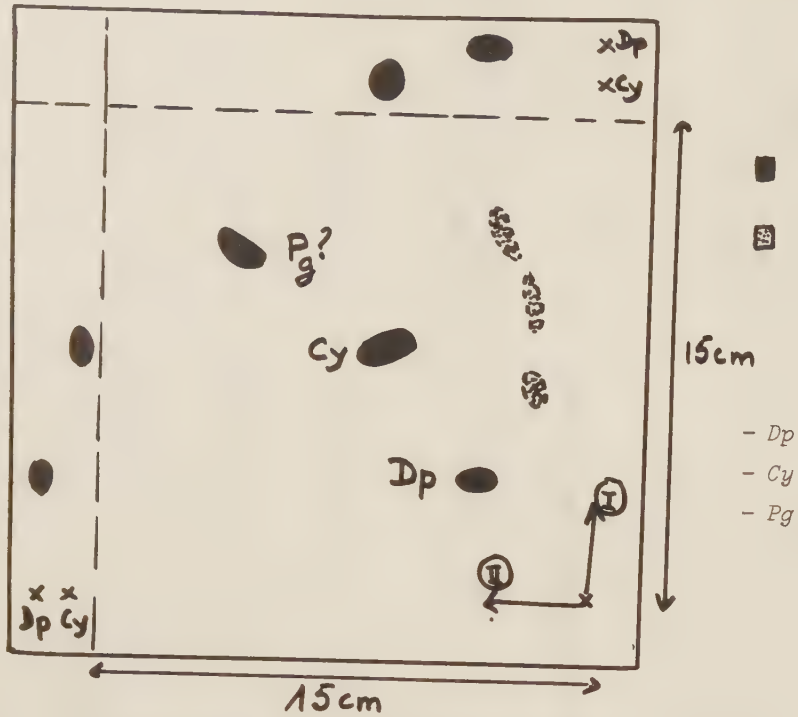
Une troisième tache de :

RF { 0,70 ; 0,80 sur papier,

correspond probablement au *pélargonidol*.

Il existe également une série d'autres taches à contours plus diffus qui résultent d'artefacts ou de flavones non hydrolysées.

SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE DES ANTHOCYANIDOLS DES FEUILLES DE COMBRETUM MICRANTHUM

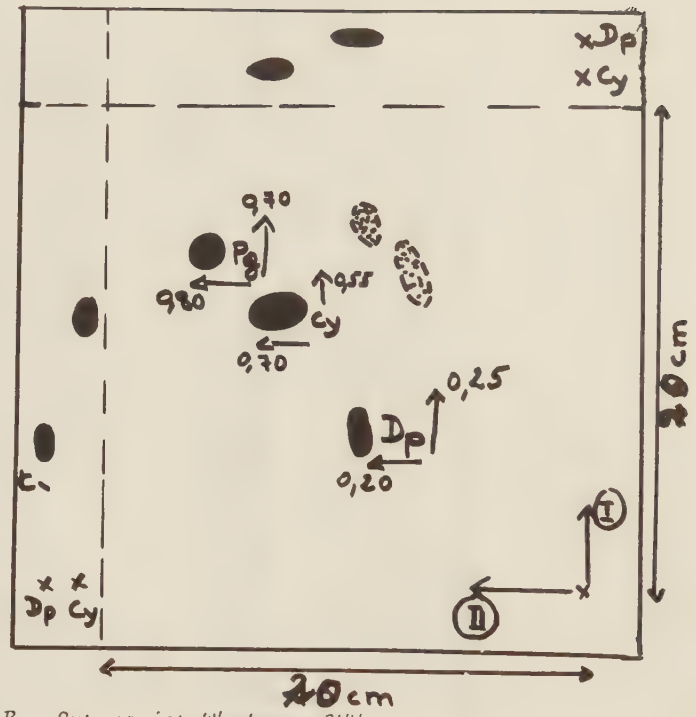


- *Dp = Delphinidol*
- *Cy = Cyanidol*
- *Pg = Pelargonidol*

A - *Sur couche mince de cellulose/Sur feuillets d'aluminium*

I (Forestal

II { Alcool anylique 2
{ Acide acétique 1
{ Eau 1



B - *Sur papier Whatmann 3MM*

I (Forestal

II (Butanol saturé de Hcl 2N

F I G U R E XXV

E - DISCUSSION

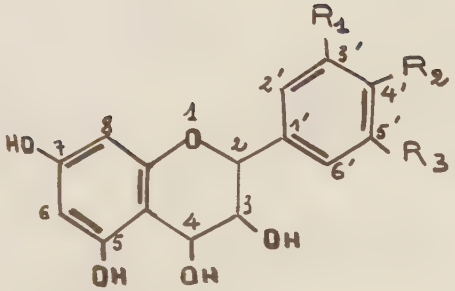
En conclusion de cette étude des proanthocyanidols et des anthycyanidols dérivés, nous pouvons confirmer la présence d'oligomères flavanediioliques dans les feuilles de Combretum micranthum alors que les feuilles de Combretum glutinosum en sont dépourvus dans les échantillons étudiés.

Les méthodes d'étude employées ne nous permettent cependant pas d'affirmer s'il s'agit de monomères, de dimères ou de trimères, unis aux catéchines à l'état naturel.

L'identification chromatographique du cyanidol, du delphinidol et moins sûrement du pélargonidol nous amène à penser que les structures de base de ces oligomères proanthocyaniques sont constituées par :

- le procaynidol ("leucocyanidol"),
- le prodelphinidol ("leucodelphinidol"),
- le propélargonidol ("leucopélargonidol") éventuellement.

-:-



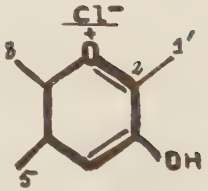
PROANTHOCYANIDOL
(Flavane-diol-3,4)
chromogène incolore

Procyanidol { R_1, R_2 = OH ; R_3 = H } —(O_2, Hcl, 100°)→ *Cyanidol*

Prodelphinidol { R_1, R_2, R_3 = OH } —(O_2, Hcl, 100°)→ *Delphinidol*

—(O_2, HCl, 100°)→ *ANTHOCYANIDOL (Chlorure)*

Propélargonidol { R_1, R_3 = H ; R_2 = OH } —(O_2, Hcl, 100°)→



ION FLAVYLIUM
(coloration rouge)

F I G U R E XXVI

Chapitre III

ETUDE PARTICULIERE DES DERIVES FLAVONIQUES DU COMBRETUM GLUTINOSUM

Dans les essais préliminaires nous avons mis en évidence des dérivés flavoniques dans le Combretum glutinosum et dans le Combretum micranthum par la réaction de la "cyanidine" sur les infusés à 10 %. La coloration jaune orangée obtenue oriente vers les flavones (absence d'hydroxyle en 3). Or nous savons que de tels composés sous forme C-hétérosidique (Vitexine et homovitexine) ont été isolés du kinkébiba (Combretum micranthum) par JENTZSCH (37).

Mais pour bien conduire nos recherches, il importait pour nous de ne pas avoir d'idées préconçues. Aussi avons-nous tenté l'extraction et l'isolement des dérivés flavoniques par des méthodes générales, non spécifiques des C-hétérosides, afin de procéder à l'étude physico-chimique des constituants isolés.

A - METHODES D'EXTRACTION

Plusieurs méthodes ont été essayées :

1 - EXTRACTION PAR L'EAU BOUILLANTE

Etant donné que l'infusé aqueux constitue la forme d'utilisation de la drogue en médecine populaire, c'est la première méthode d'extraction qui nous vient à l'esprit.

Elle est effectuée dans une cuve étanche. Pour 100 g de poudre de feuilles nous utilisons 2 litres environ d'eau distillée.

La solution aqueuse filtrée, est concentrée fortement à l'évaporateur sous pression réduite, puis épuisée successivement par l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle.

Cette méthode a été abandonnée d'une part à cause de la difficulté d'évaporation d'une grosse quantité d'eau, d'autre part par la teneur importante de tanins dans l'extrait.

2 - EXTRACTION PAR SOLVANTS SUCCESSIFS AU SOXHLET

200 g de poudre de feuilles sont épuisés à chaud dans un appareil de Soxhlet à l'aide de solvants de plus en plus polaires (éther de pétrole, chloroforme, éther éthylique, acétate d'éthyle, acétone, alcool éthylique à 96°) pendant 5 heures chacun.

Les différentes liqueurs extractives sont filtrées et concentrées sous pression réduite à 200 ml environ. Les réactions de caractérisation des dérivés flavoniques effectuées sur ces extraits, ainsi que leur étude chromatographique, montrent que les flavonoïdes sont surtout extraits à partir de l'acétate d'éthyle.

Mais les extraits éthéro-acétique, acétonique et éthanolique contiennent également de nombreuses impuretés notamment des tanins et la purification des flavonoïdes s'est avérée difficile.

Nous n'avons donc pas retenu cette méthode.

3 - METHODE CHOISIE : EXTRACTION PAR LE METHANOL BOUILLANT (selon la technique de Charaux - Paris)

300 g de poudre de feuilles (stabilisées par des vapeurs d'alcool éthylique à 96° bouillant) sont d'abord dégraissées par l'éther de pétrole pendant 5 h., puis épuisées par le méthanol bouillant pendant 24 h., au Soxhlet.

La liqueur extractive est filtrée, concentrée à sec ; le résidu est repris par 150 ml environ d'eau bouillante. Le filtrat est dégraissé par l'éther éthylique puis épuisé dans une ampoule à décantation, successivement par :

- 2 l d'acétate d'éthyle par fractions de 100 ml,
- 2 l de n-butanol par fractions de 100 ml.

Les liqueurs organiques sont déshydratées sur $Na_2 SO_4$ sec, filtrées, concentrées sous pression réduite :

- La liqueur éthéro-acétique est évaporée à sec ; le résidu est desséché sous cloche à vide en présence d'anhydride phosphorique, pesé, soit un résidu sec : E = 3,30 g, donnant une intense coloration orangée avec le réactif au magnésium-chlorhydrique (réaction de la "cyanidine").
- Au cours de la concentration de la liqueur butanolique, il se forme un

précipité jaune qui est recueilli par centrifugation, desséché et pesé :

Px = 0,720 g.

Ce produit ne donne aucune coloration avec le réactif au magnésium-chlorhydrique, alors qu'il se colore en bleu-noir avec le chlorure ferrique.

. Rf en chromatographie sur papier { Mélange de Partridge : 0,05 à 0,10 ; CH_3 COOH à 60 % ..... : 0,12 à 0,15.

Il s'agit vraisemblablement d'un gallo-tanin.

- Après élimination de ce précipité tannique la liqueur surnageante butanolique est évaporée à sec et le résidu est desséché dans les mêmes conditions que précédemment : soit E_2 = 1,600 g, donnant également une intense coloration orangée avec le réactif au magnésium chlorhydrique.

Nous avons effectué une étude chromatographique sur papier whatmann dans le mélange de Partridge, des deux extraits E_1 et E_2. D'après l'aspect des chromatogrammes, ils ont une composition identique et semblent contenir au moins 4 flavonoïdes, mais également des tanins dont celui de Rf 0,05 à 0,10 (Px), qui gênent la migration des flavonoïdes.

- Purification :

Les deux extraits ont été réunis, dissous dans le minimum d'alcool éthylique à 40° bouillant. Il se forme un précipité par refroidissement qu'on laisse déposer pendant deux jours ; il est recueilli sur verre fritté, déshydraté sous "vide phosphorique" et pesé, soit E_3 = 2 g, riche en flavonoïdes et débarrassé de la plupart des impuretés.

B - ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'EXTRAIT TOTAL : E_3

Le mélange E_3 est soumis à la chromatographie sur papier whatmann n°1, et sur couche mince de cellulose et de Kieselgel G. Merck.

- Mélanges solvants :

Sur Papier :

. 1 - Mélange de Partridge : n butanol : 4 ; CH_3 COOH : 1 ; Eau : 5

. 2 - Acide acétique à 60 %.

Sur couche mince de cellulose étalée sur feuillets d'aluminium :

. Acide acétique à 60 %.

Sur Kieselgel GF. Merck (avec indicateur fluorescent) :

. Acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:16,5:13,5).

- *Dépôts :*

Les prises d'essai sont de 20 µl de solution méthanolique à 1 g p.100.

- *Révélateurs :*

. Vapeurs d'ammoniaque.
. Solutions de trichlorure d'aluminium à 1 % dans l'alcool éthylique à 96°.

Les flavonoïdes présentent une fluorescence brune sous UV et se colorent en jaune avec NH_3 et Al cl_3.

- *Résultats :*

Dans tous les chromatogrammes il apparaît 5 spots : X_1, F_1, F_2, F_3 et F_4.

- La substance X_1 qui apparaît brun-marron sur les chromatogrammes :

Rf 0,05 - 0,10 dans le solvant de Partridge
0,15 dans l'acide acétique à 60 %

est identique à la substance Px isolée lors de la concentration de l'extrait butanolique et identifiée à un gallo-tanin.

- Les substances F_1, F_2, F_3 et F_4, qui apparaîssent brun-violet sous UV et colorées en jaune verdâtre par les réactifs de révélation, correspondent à des dérivés flavoniques.

Le tableau (XIX) rassemble les Rf obtenus pour les substances dans les différents systèmes.

(Voir tableau XIX, page suivante).

SYSTEMES		F_1	F_2	F_3	F_4
Papier	Partridge	0,30	0,35	0,45	0,50
	CH_3 COOH 60 %	0,50	0,70	0,75	0,65
Cellulose sur aluminium	CH_3 COOH à 60 %	0,40	0,60	0,70	0,55
Kieselgel GF	Acétate d'éthyle 100 Méthanol ..... 16,5 Eau 13,5	0,18	0,40	0,55	0,50

TABLEAU XIX

C - PURIFICATION DU MELANGE E_3 : OBTENTION DE FLAVONOÏDES TOTAUX PURIFIES

Nous avons essayé de séparer les constituants de E_3 par chromatographie préparative sur couche mince de Kieselgel GF, avec le solvant :

. Acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:16,5:13,5).

1 - TECHNIQUE DE PREPARATION DES PLAQUES

60 g de Kieselgel GF Merck sont mis en suspension dans 120 ml d'eau distillée. La suspension homogène est étalée sur des plaques (20 × 20 cm) selon une épaisseur de 0,50 mm.

Les plaques sont alors abandonnées 24 h. à la température du laboratoire puis portées à l'étuve à 110° pendant 2 h.

2 - DEPOTS

Les prises d'essai sont de 50 mg environ d'extrait E_3 en solution méthanolique à 1 % pour chaque plaque.

Les dépôts sont effectués à l'aide d'une seringue fixée sur un applicateur automatique linéaire (CAMAG) sur toute la largeur des plaques à 1 cm des bords, selon une ligne continue.

Après migration ascendante du solvant sur 15 cm, les zones correspondant aux flavonoïdes sont repérées en lumière ultraviolette. Nous constatons alors que la séparation des quatre flavonoïdes n'est pas aussi nette qu'en chromatographie analytique dans le même système. Les différentes zones se chevauchent. Par contre elles sont bien distinctes de la zone correspondant au tanin dont le coefficient de migration est à peu près nul.

A défaut de pouvoir séparer les flavonoïdes par cette technique préparative, nous en avons fait une méthode de purification permettant de les débarrasser des tanins en ne récupérant que les zones correspondant aux flavones par élution dans du méthanol.

Plusieurs séries de plaques nous ont ainsi permis de séparer 1,5 g de flavonoïdes totaux purifiés, soit E_4.

D - ESSAIS D'HYDROLYSE DE E_4 - IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE.

Nous avons recherché si les flavonoïdes totaux ainsi purifiés sont des hétérosides en les soumettant à l'hydrolyse acide.

Il a été alors constaté que, même en faisant varîer le temps d'hydrolyse (1 h. à 4 h.) et la concentration de l'acide sulfurique (N à 2 N) au bain-marie bouillant, il ne se produit aucune variation des Rf des taches par rapport au mélange non soumis à l'hydrolyse.

Nous avons alors pensé à l'existence de C-hétérosides flavoniques semblables à ceux qui ont été isolés du Combretum micranthum. Un essai comparatif effectué avec un extrait de Combretum micranthum confirme cette hypothèse.

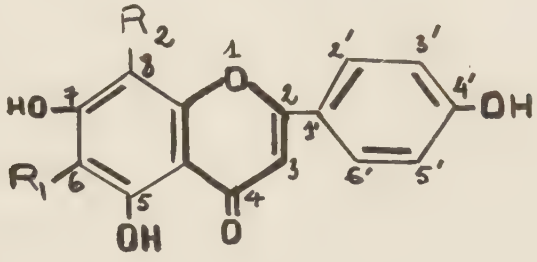
L'étude chromatographique a donc été refaite en présence de témoins de Vitexine, d'homovitexine (saponarétine), d'orientine, d'homo-orientine, et de saponarine (Vitexoside ou glucosyl-vitexine) (*).

D'après les Rf, nous notons les identités suivantes :

- F_1 = orientine
- F_2 = homovitexine
- F_3 = homo-orientine
- F_4 = vitexine.

(*) Ces échantillons sont dus à l'obligeance de Monsieur le Professeur PARIS (R.) et de Monsieur PLOUVIER. Nous les remerçions bien sincèrement.

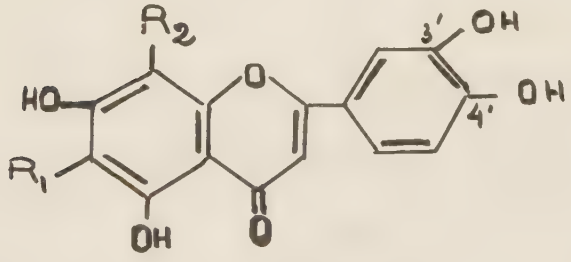
C - HETEROSIDES FLAVONIQUES DU COMBRETUM GLUTINOSUM



DERIVES DE L'APIGENINE (R_1, R_2 = H) : trihydroxy-5,7,4'flavone

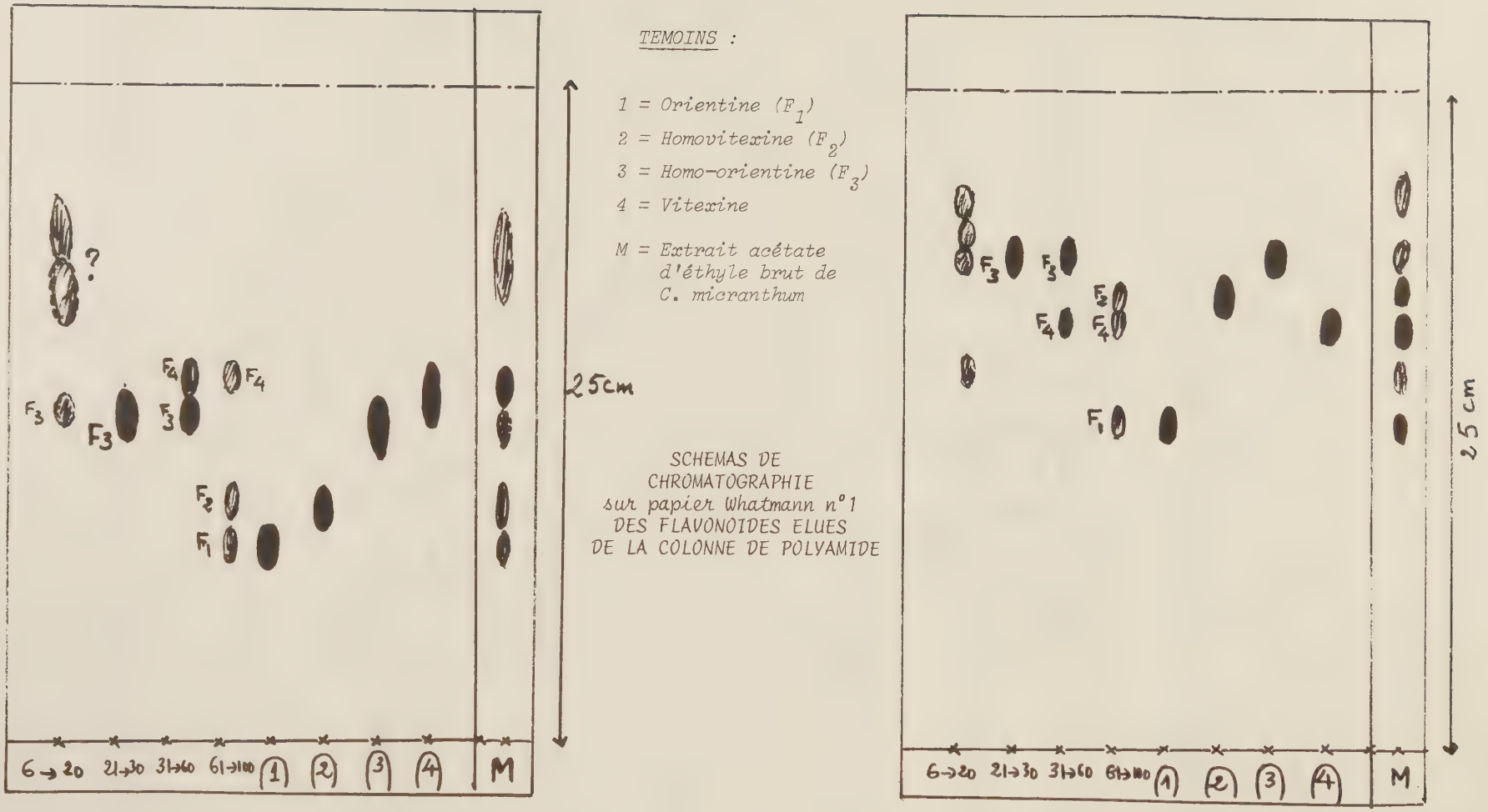
- *VITEXINE* { R_1 = H ; R_2 = glucosyl
- *HOMOVITEXINE* { R_2 = H ; R_1 = glucosyl

F I G U R E XXVII



DERIVES DE LA LUTEOLINE (R_1, R_2 = H) : tétrahydroxy-5,7,3',4'flavone

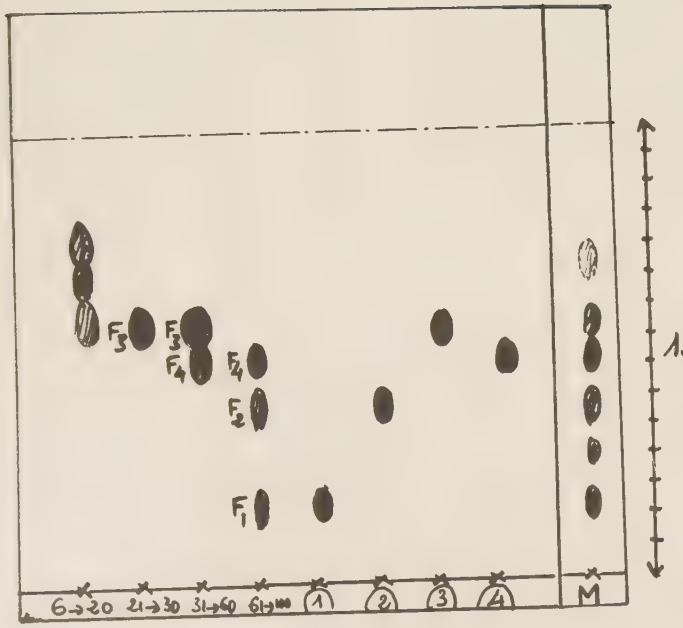
- *ORIENTINE* { R_1 = H ; R_2 = glucosyl
- *HOMO-ORIENTINE* { R_2 = H ; R_1 = glucosyl



A - *Solvant : mélange de Partridge*

B - *Solvant : acide acétique à 60 %*

F I G U R E XXVIII



TEMOINS :

1 = Orientine (F_1)

2 = Homovitexine (F_2)

3 = Homo-orientine (F_3)

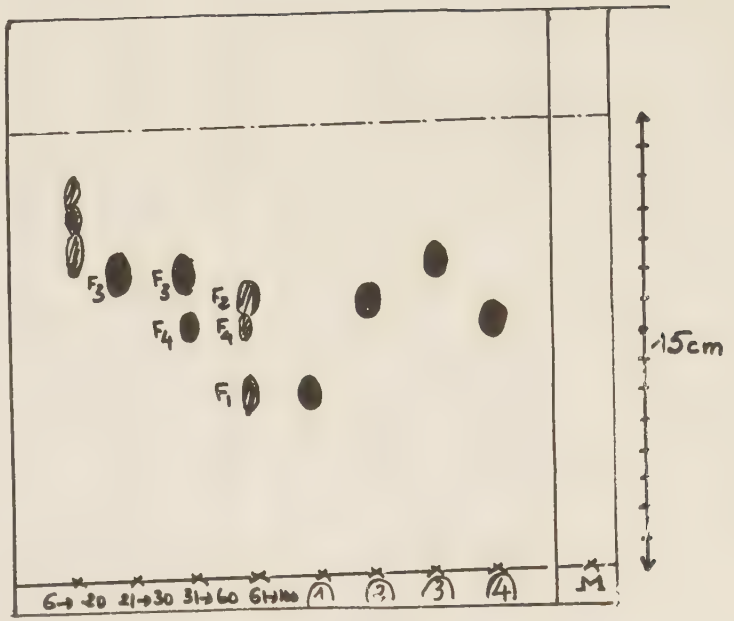
4 = Vitexine (F_4)

M = Extrait acétate d'éthyle brut de C. micranthum

Fractions

Couche mince de Kieselgel GF

Solvant { Acétate d'éthyle 100
Méthanol 16,5
Eau 13,5



Couche mince de cellulose

Solvant : acide acétique à 60 %

FIGURE XXIX

SCHEMAS DE CHROMATOGRAPHIE DES FLAVONOIDES DU C. GLUTINOSUM ELUES DE LA COLONNE DE POLYAMIDE.

E - ESSAI DE FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE POLYAMIDE DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DU MELANGE E_4 (72 - 4 bis - 10 bis)

- Un premier essai a été effectué sur colonne de cellulose avec élution par le n-butanol saturé d'eau. Il ne nous a pas permis de séparer les constituants.

Nous lui avons préféré la colonne de polyamide.

- Nous employons le polyamide Woelm pour chromatographie selon le mode opératoire suivant (72) :

60 g de polyamide sont d'abord lavés plusieurs fois à l'eau distillée tiède.

Les 3/4 de la suspension obtenue après décantation sont introduits dans une colonne de (55 × 2 cm) et tassés convenablement en s'aidant d'un léger vide.

1 g de flavonoïdes totaux dissous dans l'eau sont mélangés intimement avec les 2/3 de la suspension de polyamide qui reste. Ce mélange est versé avec précaution sur la colonne préparée et le tout est recouvert par le polyamide restant. La colonne est d'abord lavée avec 200 ml environ d'eau distillée.

Nous procédons ensuite à l'élution proprement dite en employant de l'alcool éthylique de titre croissant (30^C, 40^C, 50^C, 60^C, 70^C) ; les éluats sont recueillis par fractions de 50 ml. Les différentes fractions éluées sont soumises à une étude chromatographique rapide sur couche mince de Kieselgel (30 mn pour 10 cm de migration). Les fractions contenant les mêmes spots sont réunis et examinées plus précisément dans les différents systèmes précédemment décrits.

Les résultats obtenus sont indiqués dans les chromatogrammes schématisés (figures XXVIII et XXIX).

L'observation de ces chromatogrammes montre que seules les fractions 21 à 30, éluées avec l'éthanol à 40^C, contiennent un seul spot: F_3 identifié à l'homo-orientine.

Nous parvenons à en isoler au total :260 mg.

Les autres fractions apparaissent sous forme de mélanges de 2 à 3 flavonoïdes parfois à l'état de traces.

Seule la substance F_3 a donc été étudiée au point de vue physico-chimique.

F - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DU FLAVONOÏDE F_3

Ce produit cristallise dans l'alcool éthylique bouillant à 96°. On obtient une poudre cristalline jaune claire.

1 - PROPRIETES PHYSIQUES

a) Solubilités :

Il est insoluble dans l'éther et le chloroforme, peu soluble à froid dans l'eau et l'alcool éthylique à 96°, plus soluble à chaud ; assez soluble dans le méthanol et la pyridine.

b) Point de fusion au bloc Maquenne :

Il est assez difficile à déterminer par suite d'une décomposition rapide du produit entre 254 et 260°C.

c) Rf chromatographiques :

Ils sont identiques à ceux indiqués précédemment pour le flavonoïde F_3 (tableau XIX).

d) Spectre d'absorption dans l'ultra-violet (9 bis) :

Déterminé sur une solution du produit au 1/50 000 dans l'alcool éthylique purifié au spectrophotomètre UNICAM enregistreur SP.800.

A partir d'une solution mère au 1/1000 du produit dans l'alcool éthylique, ont été déterminés également les spectres ultra-violet obtenus après addition de trichlorure d'aluminium, d'acétate de sodium et d'acide borique, selon les proportions suivantes :

- *Trichlorure d'aluminium ($Al\ cl_3$) :*

  5 ml de solution-mère éthanolique au 1/1000
  0,25 g de trichlorure d'aluminium
  Alcool éthylique purifié ..... q.s.p. 25 ml,

soit une solution au 1/5000 qui est ensuite diluée au 1/10.

- *Acétate de sodium (Ac O Na) :*

5 ml de solution-mère éthanolique au 1/1000
Acétate de sodium à saturation
Alcool éthylique purifié ..... q.s.p. 25 ml,

solution également diluée au 1/10.

- *Acétate de sodium et acide borique :* à saturation.

L'addition de ces sels permet une interprétation plus précise des spectres d'absorption des substances polyphénoliques, entraînant très souvent un déplacement batochromique et un dédoublement des pics d'absorption caractéristiques :

- soit en provoquant la formation de chélate (Al cl_3) ;
- soit par ionisation due à une variation de pH (acétate de sodium).

Les résultats obtenus (figure XXX) sont réunis dans le tableau (XX) avec l'interprétation correspondant aux différents pics.

Solvant	*λ maximum (en nm)*		*INTERPRETATION*
Ethanol purifié (Et OH)	350	272	Substance du groupe des flavones. Par rapport au spectre UV de la vitexine (déterminé dans les mêmes conditions) la position du 1er pic (340 nm pour la vitexine) indique une substance plus hydroxylée sur le phényl latéral (type lutéoline ou tétra-hydroxyflavone).
Et OH + $Alcl_3$	390 et 350	304 et 280	Effet batochrome et dédoublement des pics par formation d'un chélate avec Al cl_3 : (en faveur d'un OH en 5).
Et OH + AcONa	354	300 et 276	Léger effet batochrome : (en faveur d'un OH en 4').
Et OH + AcONa + H_3BO_3	380 et 370	272	Dédoublement du 1er pic : (en faveur d'une O.dihydroxylation en 3' et 4').

TABLEAU XX

(voir figure XXX, page suivante).

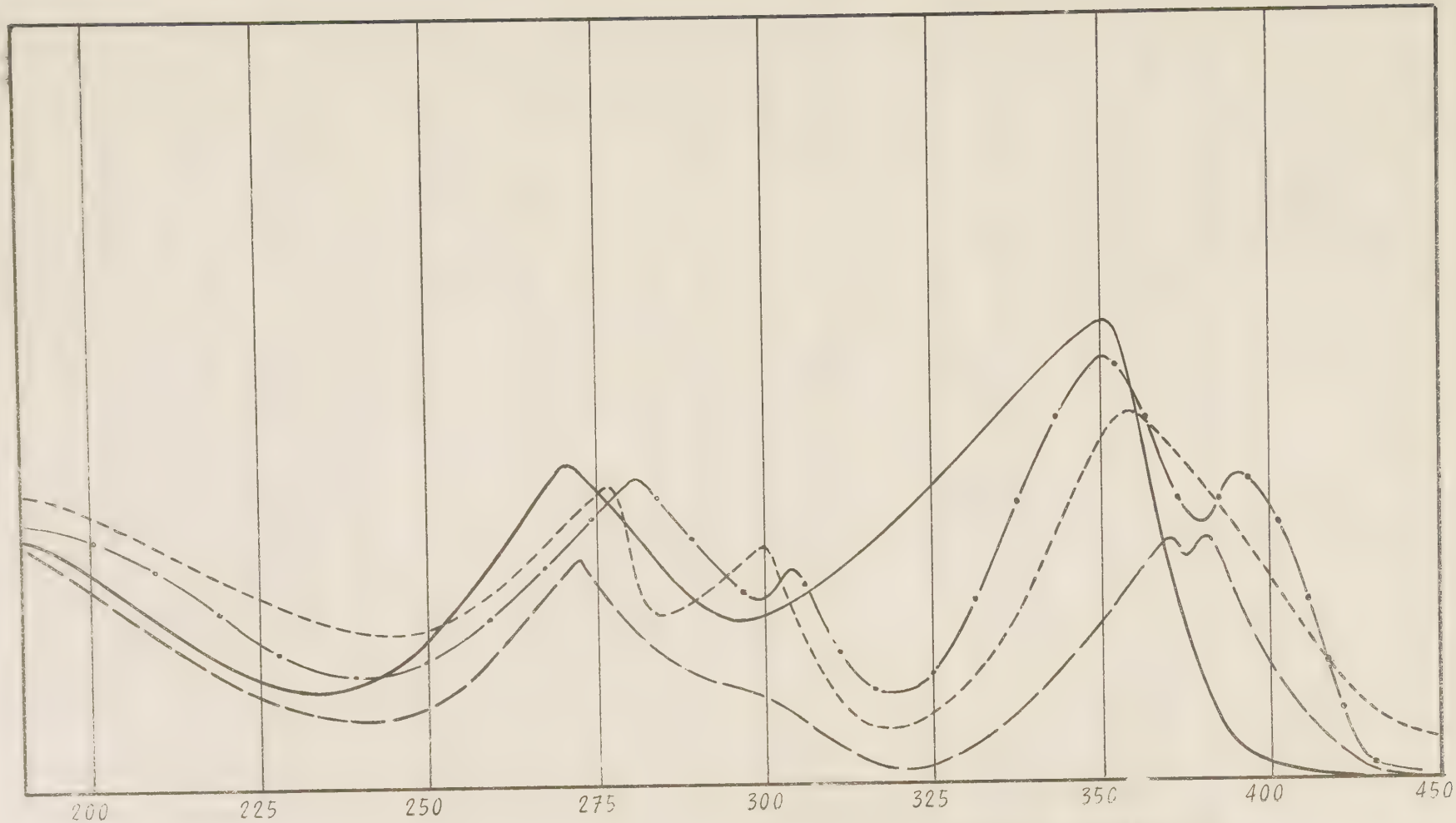


Figure XXX

Spectre ultraviolet du flavonoïde F_3 (Homo-orientine) des feuilles de Combretum glutinosum

e) Absorption dans l'infrarouge (11 bis - 17 bis) :

Déterminée à la fois pour l'hétéroside et sa génine (lutéoline).

Les spectres ont été enregistrés sur un spectrographe Perkin Elmer 237 à réseaux (4000-625 cm^{-1}), les produits étant en suspension dans le nujol. On remarque plusieurs bandes d'absorption (figures XXXI et XXXII).

- Autour de 3000 cm^{-1}, les bandes des hydroxyles libres de liaisons intramoléculaires et des hydroxyles liés (ponts hydrogènes intramoléculaires), sont masquées par le pic du nujol.
- 1650 cm^{-1} : carbonyle en 4 conjugué avec les noyaux A et B chez les dihydroxy-5,7 flavones.
- Bandes phényle :
  - . 1610 et 1510 cm^{-1} : bandes corrélatives des doubles liaisons aromatiques du cycle phényle.
  - . 1580 cm^{-1} : phényle conjugué avec une double liaison extranodale.
- 1365 cm^{-1} (masqué par le nujol) et 1190 cm^{-1} : hydroxyles phénoliques.
- 1160 cm^{-1} : métadisubstitution des dihydroxy-5,7 flavonoïdes.
- 1080 - 1040 cm^{-1} : hydroxyles du sucre.

  Ces bandes sont absentes dans le spectre de la génine.
- 840 cm^{-1} : fréquence de vibration des hydrogènes aromatiques isolés (noyau aromatique substitué).

Les autres fréquences inférieures à 1000 cm^{-1}, relatives aux modes de vibration des hydrogènes sont complexes et difficiles à attribuer.

f) Résonnance magnétique nucléaire (13 bis) :

Le spectre RMN a été enregistré sur un spectromètre "VARIAN A 60 A", le produit étant dissous dans le méthanol deutérié (CD_3OD) en présence de tétraméthylsilane comme étalon interne.

Nous observons 2 zones distinctes (fig. XXXIII).

1°) Entre 5,5 ppm et 3,3 ppm : un ensemble complexe de signaux dus au radical glycosyl.

2°) Des signaux bien distincts correspondant aux protons benzéniques :

- 7,30 ppm : Multiplet de 2 protons ($H_{6'}$ et $H_{5'}$) ;
- 6,90 - 6,75 ppm : Multiplet de 1 seul proton ($H_{2'}$) ;

FIGURE XXXI

Spectre I.R. de F3 (Homoorientine) (Nujol)

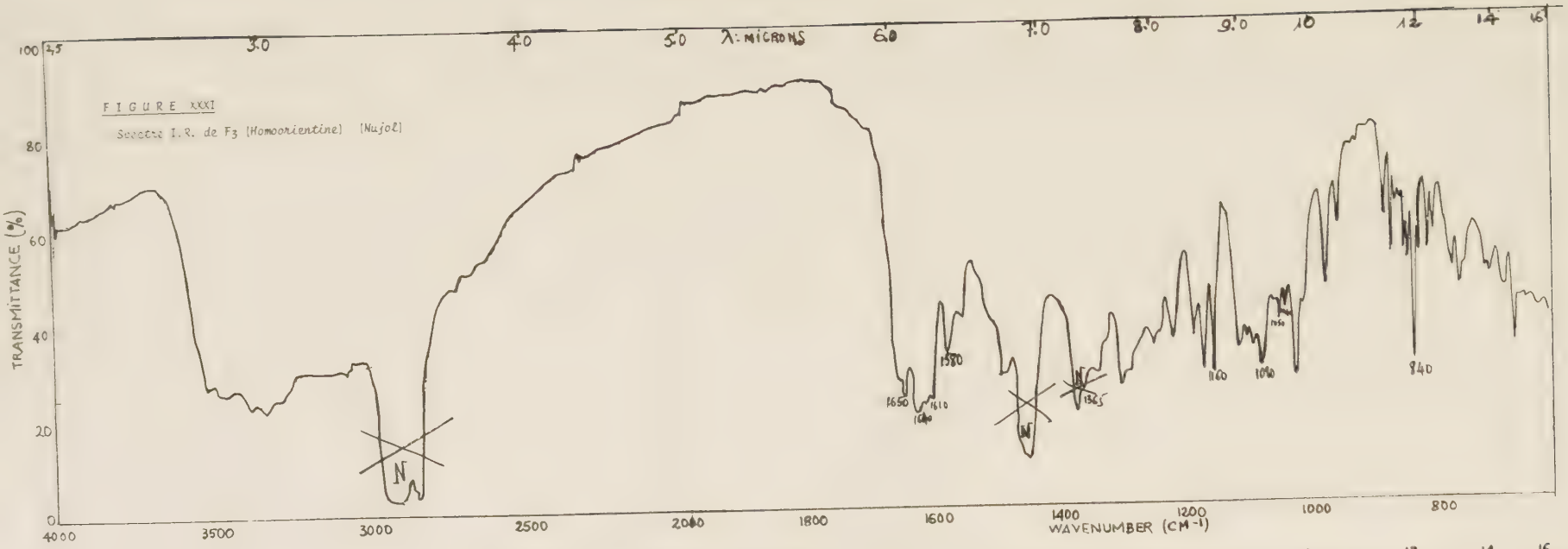
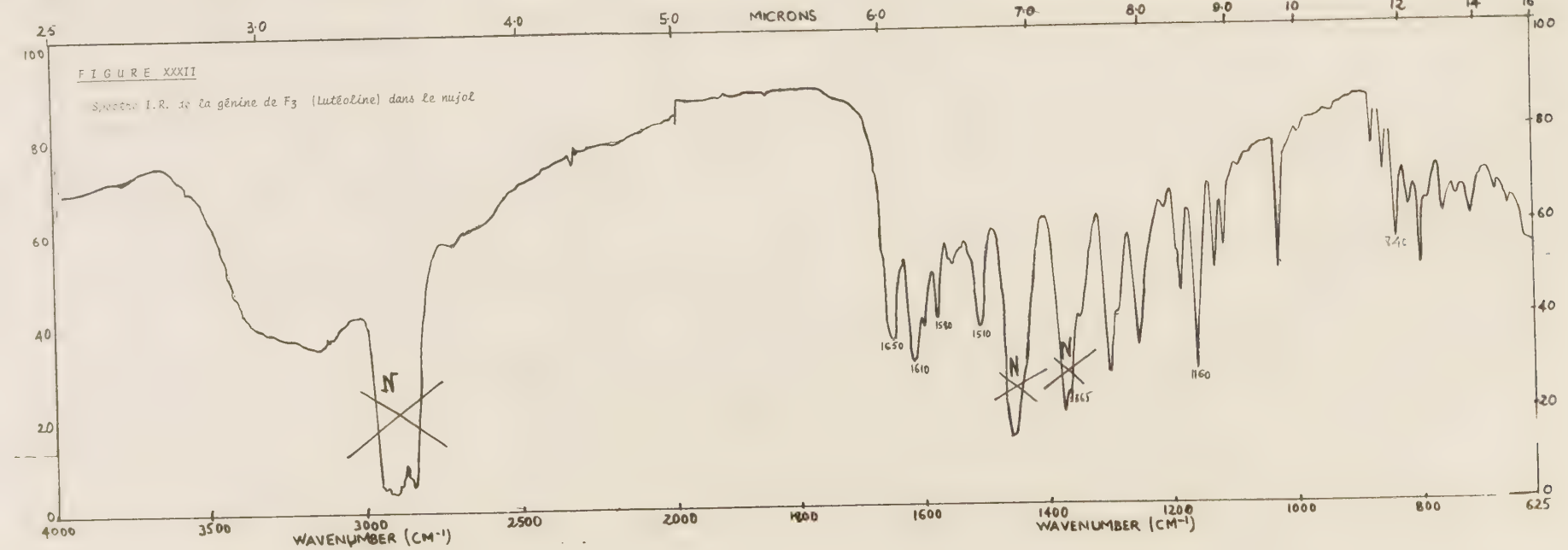
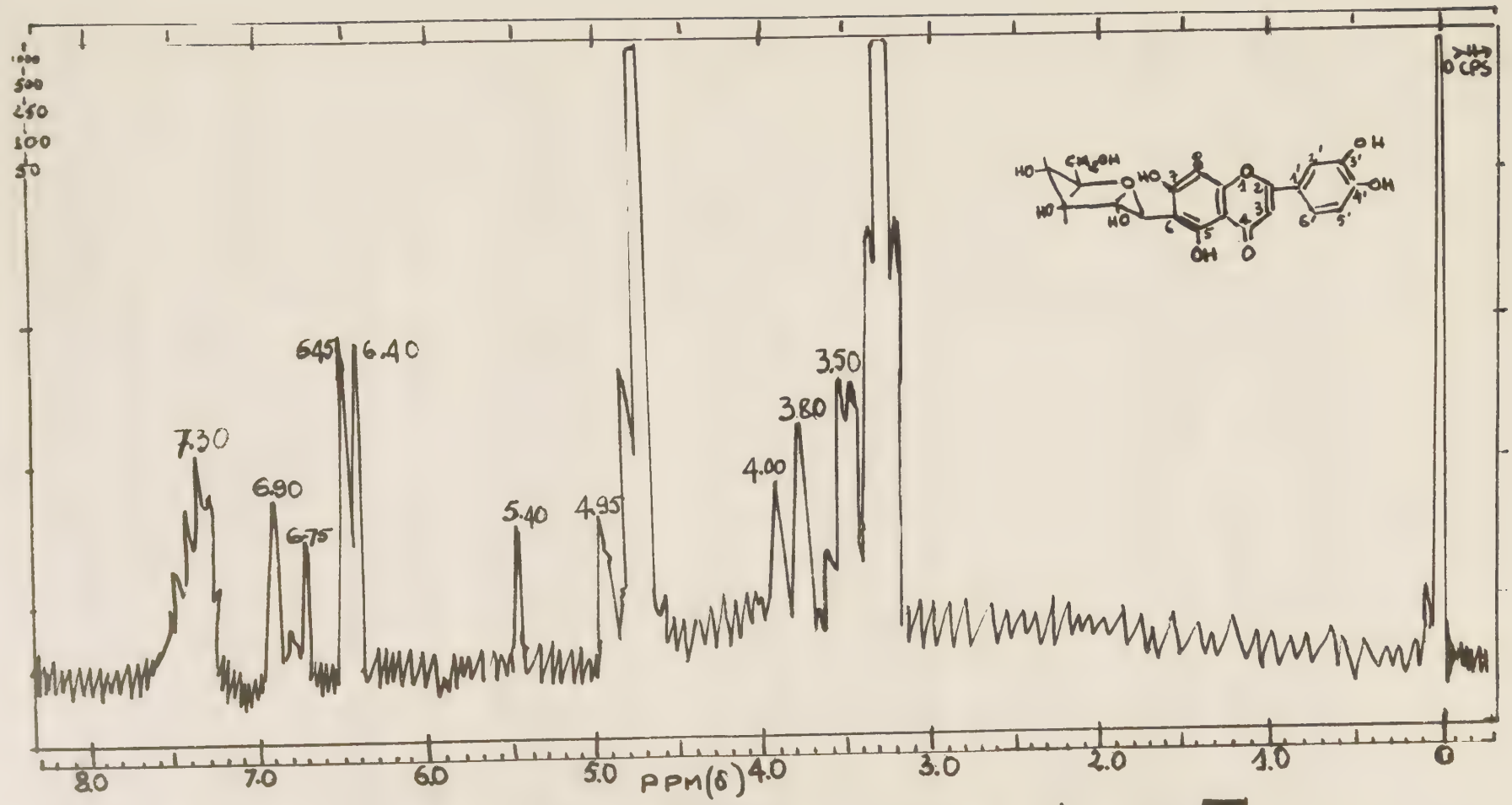


FIGURE XXXII

Spectre I.R. de la génine de F3 (Lutéoline) dans le nujol





Spectre RMN de La Substance F_3

Homoorientine

FIGURE XXXIII

- 6,45 et 6,40 ppm : 2 singulets correspondant chacun à 1 proton (H_8 et H_3).

On remarque qu'il n'existe pas de système A_2 X_2, ce qui prouve bien une double hydroxylation en 3' et 4' du phényl latéral.

Comme dans les spectres des hétérosides digitaliques de l'Antiaris africana, nous notons ici également les raies parasites résultant d'échanges isotopiques.

2 - PROPRIETES CHIMIQUES

a) Réactions colorées :

Avec le magnésium en milieu acide chlorhydrique (réaction de la cyanidine), on obtient une coloration orangée en faveur d'une flavone.

b) Hydrolyse acide oxydante :

L'essai d'hydrolyse en milieu acide simple s'étant révélé infructueux, nous avons opéré dans des conditions plus énergiques en présence d'un oxydant (perchlorure de fer) et de Hcl concentré. Cette hydrolyse oxydante permet la rupture de la forte liaison C-C entre la génine et le sucre.

A 100 mg de produit on ajoute 30 ml d'eau distillée, 5 ml de solution concentrée de chlorure ferrique et 5 ml de Hcl concentré. On porte 4 h. au bain-marie bouillant sous réfrigérant à reflux, laisse refroidir ; il se forme un précipité que l'on recueille soigneusement sur verre fritté, lave par de petites quantités d'eau distillée froide, sèche et pèse, soit 25 mg de génine (rendement : 25 %).

c) Etude chromatographique de la génine :

Le précipité est soumis à la chromatographie sur papier dans le solvant de Partridge comparativement à des témoins d'apigénine et de lutéoline.

Rf : 0,80.

Nota : Dans de pareilles conditions d'hydrolyse, le sucre (glucose) n'est pas caractérisable en chromatographie.

d) Microdégradation alcaline de la génine :

Cette méthode est classique pour l'étude structurale des dérivés flavoniques.

L'action de la potasse à chaud provoque une rupture du noyau central γ-pyrone. Il y a libération d'un phénol provenant de la benzopyrone et d'un acide phénol provenant du noyau aromatique latéral.

- *Technique :*

A 20 mg de la génine obtenue placée dans un creuset en platine, on ajoute quelques cristaux de potasse et quelques gouttes d'eau. On porte pendant 5 mn dans un four à moufle chauffé à 300°.

Après refroidissement on ajoute goutte à goutte quelques ml d'eau distillée ; la solution est transférée dans une ampoule à décantation, acidifiée à pH 2-3 par $H_2 SO_4$ concentré et épuisée à plusieurs reprises par quelques ml d'éther éthylique qui extrait à la fois les phénols et les acides aromatiques.

Les solutions éthérées, déshydratées sur $Na_2 SO_4$ sec sont filtrées, évaporées à sec. Le résidu est repris dans le minimum de méthanol et soumis à la chromatographie sur papier dans le mélange de Partridge en présence de témoins de phloroglucinol, d'acide p-hydroxybenzoïque et d'acide protocatéchique.

Dépôts : 20 µl d'extrait et 10 µl de témoins en solution méthanolique à 0,5 %.

Comme révélateur nous employons le perchlorure de fer ou la p. nitraniline diazotée.

- *Résultats :*

L'extrait examiné donne 2 taches :

- une tache violette : Rf : 0,70, correspondant au phloroglucinol ;
- une tache jaune verdâtre : Rf : 0,80, correspondant à l'acide protocatéchique.

Le produit de départ correspond donc à la lutéoline.

e) Conclusions sur l'étude des dérivés flavoniques :

- La substance F_3 isolée à l'état pur présente tous les caractères (spectre UV, IR, RMN, produits d'hydrolyse et de la dégradation alcaline) d'une héxityl-lutéoline.

D'après les Rf en chromatographie il s'agirait de l'homoorientine ou 6-C glucosyl-lutéoline (74).

- Les autres flavonoïdes F_1, F_2 et F_4 n'ont pas été isolés en quantité suffisante à l'état pur pour permettre leur étude physicochimique. Mais d'après les Rf obtenus dans différents systèmes chromatographiques en présence de témoins purs, ils ont été identifiés respectivement :

MICRODEGRADATION ALCALINE

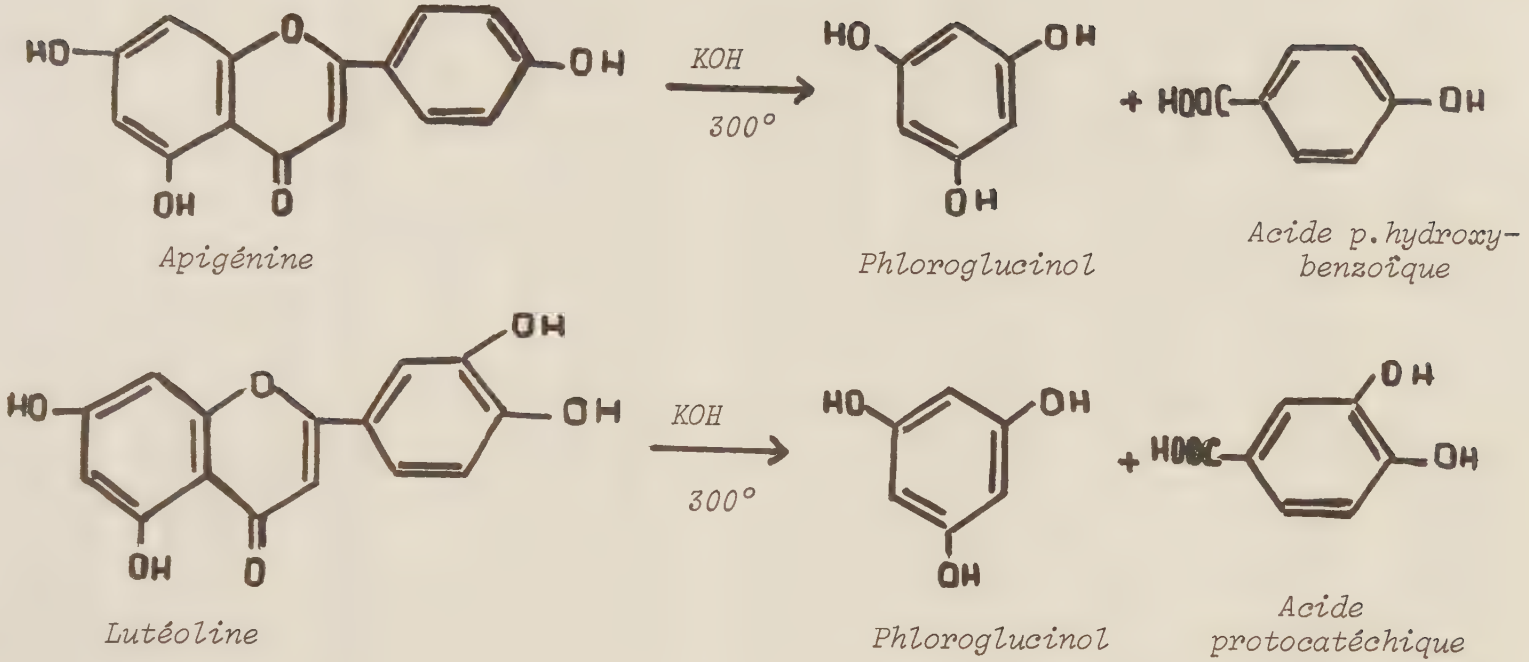


FIGURE XXXIV

F_1 = orientine,
F_2 = homovitexine,
F_4 = vitexine.

Ces résultats nous permettent de conclure à l'identité des flavonoïdes de feuilles de Combretum micranthum et de Combretum glutinosum.

Il s'agit dans les deux espèces de C-flavonosides du groupe de l'apigénine (vitexine ou orientine) et du groupe de la lutéoline (homovitexine et homo-orientine).

CONCLUSIONS GENERALES

Nos travaux ont été consacrés à l'étude de quelques représentants de la flore médicinale du Sénégal :

- *Antiaris africana Engl.*
- *Combretum glutinosum Pers.*
- *Combretum micranthum G. Don.*

I - ANTIARIS AFRICANA ENGL.

C'est un grand arbre de la famille des Moracées, que l'on trouve surtout dans la région phytogéographique "Guinéo-soudanienne" du pays.

Il est relativement peu utilisé en médecine populaire, en dehors des écorces qui entrent dans des préparations anti-lépreuses. Sa toxicité est mise en doute par nos informateurs sénégalais ; alors que son homologue asiatique, l'*Antiaris toxicaria* Lesh., est bien connu comme poison de flèche sous le nom de "Upas-Antiar" ou "Ipoe".

- *Au point de vue botanique,* nous avons rappelé les caractères généraux de la famille des Moracées et du genre Antiaris, précisé leur classification, donné la description de l'espèce *Antiaris africana* en rapportant les résultats de nos enquêtes ethno-botaniques sur l'habitat et les usages de cette plante.

Nous avons procédé à l'étude anatomique de la tige et des feuilles :

- Dans la tige on note une zone corticale pluristrate, la présence de structures secondaires dans le phloème et xylème, un appareil sécréteur important avec des cellules à contenu résineux et des laticifères vrais.

- La feuille comporte une nervure centrale à moelle sclérifiée avec de nombreux amas de liber, un limbe de type isolatéral avec un hypoderme hétérogène, un appareil sécréteur identique à celui de la tige.

- *Sur le plan chimique,* nous avons d'abord rappelé les nombreux travaux antérieurs consacrés presque exclusivement à l'*Antiaris toxicaria* Lesh. et relatifs à ses constituants digitaliques abondants dans le latex et les graines.

Nous nous sommes proposé d'étudier les composants de l'*Antiaris africana* sur lesquels nous disposons de peu de renseignements.

Après avoir décrit les réactifs généraux que nous avons utilisés, nous avons exposé nos recherches préliminaires sur les feuilles, les écorces et le suc :

- nous n'avons trouvé aucune trace d'alcaloïdes dans les échantillons étudiés ;
- les feuilles sont dépourvues d'hétérosides digitaliques, les écorces n'en contiennent que des traces alors que le suc en renferme des proportions notables.

C'est donc sur les hétérosides digitaliques du suc qu'ont porté essentiellement nos travaux :

Après extraction et purification, une étude chromatographique nous a permis de mettre en évidence une dizaine d'hétérosides.

Les principaux d'entre eux ont été isolés par chromatographie de partage sur colonne de Kieselguhr et identifiés.

Nous avons pu caractériser cinq hétérosides digitaliques déjà signalés dans l'*Antiaris toxicaria :*

- α-*antiarine,*
- β-*antiarine,*
- *antioside,*
- *convallatoxine,*
- *"substance E de Dolder".*

Leur identification a été confirmée par une série de mesures :

. Analyse élémentaire.
. Rf chromatographiques sur papier et sur couche mince.
. Point de fusion.

- Pouvoir rotatoire.
- Spectres : U.V - I.R - R.M.N.
- Réactions colorées.
- L'étude analytique des génines et des sucres, ainsi que des dérivés acétylés et benzoylés.

Nos résultats sont concordants et nous permettent de conclure que la composition chimique de l'*Antiaris africana* Engl. est pratiquement identique à celle de l'*Antiaris toxicaria* Lesh.. Ils sont en accord avec une hypothèse formulée au sujet de l'*Antiaris toxicaria* et d'autres plantes à hétérosides cardiotoniques (Strophantus) : si la composition chimique du suc est indépendante de la période de récolte du point de vue qualitatif, le lieu de récolte exerce par contre une influence notable.

Il semble en effet que l'α-antiarine et la β-antiarine (hétérosides majeurs du suc d'Antiaris ne diffèrant que par leur partie sucrée) ne coexistent pas sur le même pied, ou du moins, que l'une d'elles est toujours prépondérante.

D'autre part si le suc d'*Antiaris africana* n'est pas réputé toxique c'est sans doute par ignorance ou par suite d'une enquête insuffisante de notre part.

II - *COMBRETUM glutinosum* PERR. et *COMBRETUM micranthum* G. DON (combrétacées)

Le *Combretum micranthum* G. Don *(Combretum altum)* ou Kinkéliba, inscrit à la pharmacopée française depuis 1937, a déjà fait l'objet de nombreux travaux.

En ce qui concerne le *Combretum glutinosum* Perr., nous n'avons relevé aucune étude chimique concernant ses feuilles qui constituent une des drogues les plus utilisées en médecine populaire sénégalaise. Très souvent les usages thérapeutiques se recoupent avec ceux du véritable kinkéliba, à tel point que les usagers non avisés les confondent sous la même dénomination commune.

Nous avons été ainsi conduit à l'étude comparative des deux espèces.

Nous avons d'abord décrit les caractères généraux des Combrétacées et du genre Combretum et rapporté les résultats de nos enquêtes ethnobotaniques sur le *Combretum glutinosum*, plante arbustive spontanée, très abondante dans tout le Sénégal. Elle est tenue en grande estime par de nombreux utilisateurs pour ses vertus thérapeutiques multiples, à telle enseigne qu'elle a fait l'objet d'une expérimentation clinique

dans un centre hospitalier de Dakar avant même sa connaissance chimique.

Nous avons rapporté les conclusions de cette expérimentation qui a notamment mis en évidence ses propriétés : diurétique hépatobiliaire et hypotenseur d'appoint.

Nous avons ensuite précisé les conditions de récolte et de conservation des drogues imposées par les substances polyphénoliques très fragiles.

- *Au point de vue botanique*, après avoir rappelé les travaux antérieurs sur les deux Combrétacées, nous avons procédé à l'étude anatomique des tiges et des feuilles de *Combretum glutinosum* à l'issue de laquelle nous trouvons de nombreuses similitudes avec le *Combrethum micranthum*.

- *Au point de vue chimique*, nous avons également fait le point de nos connaissances antérieures sur le *Combretum micranthum* et procédé à l'étude comparée des deux espèces.

Dans nos recherches préliminaires, nous avons décelé sensiblement les mêmes principes (tanins catéchiques et galliques, flavonoïdes acides organiques phénoliques), ce qui est en accord avec nos connaissances sur le *Combretum micranthum*. D'autre part, nous n'avons pas décelé dans le *Combretum glutinosum* de proanthocyanidols, que nous avons au contraire mis en évidence dans le *Combretum micranthum* ; ils ont fait l'objet de nos investigations.

Après leur extraction sélective par une méthode appropriée permettant de les séparer des polymères (tannoïdes), la chromatographie des chromogènes et des anthocyanidols correspondants nous a permis de caractériser nettement du *procyanidol*, du *prodelphinidol* et moins sûrement du *propélargonidol*.

Nous avons également noté dans le même extrait la présence d'une gallo-catéchine identique probablement au "Combretum catéchine" signalé par certains auteurs.

Nous avons enfin étudié les constituants flavonoïdes du *Combretum glutinosum* en vue de les comparer à ceux isolés de *Combretum micranthum* (vitexine et homovitexine).

Nous avons procédé à leur extraction, à leur purification par chromatographie préparative, à leur identification par rapport à des échantillons témoins dans différents systèmes en chromatographie sur papier et sur couche mince.

Nous avons ainsi identifié :

- *la vitexine,*
- *l'homovitexine,*
- *l'orientine,*
- *l'homo-orientine.*

Il s'agit donc de C-hétérosides flavoniques comme chez le *Combretum micranthum*, qui se distinguent des O.hétérosides par leur difficulté d'hydrolyse selon les méthodes classiques ; la liaison C-C entre le sucre et la génine étant plus difficilement rompue en milieu acide que la liaison C-O des O-hétérosides.

Après des essais de fractionnement laborieux, seule l'homo-orientine a pu être isolée à l'état pur en quantité suffisante par chromatographie sur colonne polyamide.

Nous avons ainsi pu effectuer son étude physico-chimique :

- La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet, la spectrographie infrarouge, la spectroscopie RMN.
- Les réactions colorées.
- L'étude de la génine obtenue par hydrolyse oxydante.
- L'étude des produits de la microdégradation alcaline (phloroglucinol et acide protocatéchique).

Tous ces caractères sont ceux d'une hexityl-lutéoline dont les Rf chromatographiques sont identiques à ceux de l'homo-orientine.

Nos résultats permettent donc de conclure à l'identité des constituants flavoniques du *Combretum micranthum* et du *Combretum glutinosum*. La seule différence se situe au niveau des tanins catéchiques et des proanthocyanidols absents du *Combretum glutinosum,* qui contient surtout des tanins galliques.

Les fruits de *Combretum glutinosum* n'ont été examinés qu'au cours des essais préliminaires ; leur composition chimique semble assez voisine de celle des feuilles.

Au terme de ce travail sur l'étude botanique et chimique des plantes soumises à nos investigations, leur étude pharmacologique est inscrite dans nos projets immédiats.

Nous considérons ce modeste travail comme le début d'une étude d'ensemble des plantes médicinales du Sénégal. Notre satisfaction sera grande s'il apporte une contribution utile à la connaissance des "Pharmacopées traditionnelles" africaines en général, et de la flore médicinale de notre pays à laquelle nous souhaitons nous consacrer.

B I B L I O G R A P H I E

1. ABISH (E.) et REICHSTEIN (T.) -
Helv. chim. Acta, 1962, 45, 2090.

2. ADAM (J.G.) - Etude des pâturages tropicaux de la zone soudanienne. 2e part. : Botanique systématique. II, Paris, 1959.

3. ADAM (J.G.) - Contribution à l'étude de la flore et de la végétation de l'Afrique occidentale.
La Basse Casamance (Sénégal). 1ère Part., Bull. IFAN, 1961, 23, 911-993.

4. ANDERSON (D.M.W.), HIRAT (E.L.) et KING (N.J.) - Uronic acid materials. Variation in composition of gum nodules from Combretum leonense.
Talenta, 1959, 3, 118-126.

5. BALANSARD (J.) et DELPHAUT (J.) - Sur le principe alcaloïdique du kinkéliba (Combretum micranthum G.DON).
Méd. trop., 1946, 6, 139.

6. BATE-SMITH (E.C.) - Leucoanthocyanins : 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leucoanthycyanins in plant tissues.
Biochem. J., 1954, 58, 122-125.

7. BATE-SMITH (E.C.) - Paper chromatography of phenolics. Methods in polyphenol chemistry.
In Pridham (J.B.), Pergamon Press ed., Londres, 1964.

8. BATE-SMITH (E.C.) et METCALFE (C.R.) - Leucoanthocyanins. The nature and systematic distribution of tannins in dicotyledonous plants.
Journal of Linear Soc. of London , 1957 , 55
n°362, 669-704.

9. BERHAUT (J.) - Flore du Sénégal.
1ère éd., Dakar, 1954, 2e éd., 1967.

10. BISSET (N.G.) - Cardiac glycosides.
Part. VI. Moracae, the genus Antiaris Lesh.
Planta medica, 1962, 10, n°2, 143-150.

11. BLATT (M.G.) - Communication personnelle.

12. BRANDT (R.) et coll. -
Helv. chim. Acta, 1966, 49, 2469-2481.

13. BUSH (I.E.) et TAYLOR (D.A.H.) - The paper chromatographic examination of cardiac aglycones of Strophantus seeds.
Bioch. J., 1952, 52, 643.

14. CHERMEZON (H.) - Cypéracées du Sénégal.
Arch. Bot. Caen Mém., 1936, 4.

15. CHEVALIER (A.) - Exploration botanique de l'Afrique occidentale française.
1 vol., Lechevalier éd., Paris, 1920.

16. CORNER (E.J.H.) - Communication personnelle, 1956.
In Bisset (NG.), Planta medica, 1962, 10, n°2, 143-150.

17. DAFFE (M.) et MESNARD (P.) - Communication. Congrès Fédération internationale pharmaceutique, Stockholm, 1973.

*18. DAFE (M.), LEMESLE (R.), ROUSSEAU (Mlle J.) et SCHEEMACKER (H.) - Communication. Soc. Ph., Bordeaux : Séance du 10 mais 1972.

19. DALZIEL (J.M.) - The useful plants of west tropical Africa.
Londres, 1937.

20. DEVEZE (J.) - Recherches sur la digitaline officinale.
Thèse, Doct. Univ. Pharm., Bordeaux, 1951.

21. DE VRY (J.E.) et LUDWIG (E.) -
Pogg. Ann., 1838, 44, 414.
J. prakt. chem., 1868, 103, 253.

22. DOEBEL (K.), SCHLITTLER (E.) et REICHSTEIN (T.) - Beitrag zur Kentnis des α-antiarins.
Helv. chim. Acta, 1948, 31, 688-709.

23. DOLDER (F.), TAMM (Ch.) et REICHSTEIN (T.) - Die glycoside von Antiaris toxicaria Lesh.
Helv. chim. Acta, 1955, 38, 1364-1396.

24. FRANÇOIS (Mlle Th.) - Sur l'origine et l'identification du Kinkéliba.
Bull. Sc. pharmacol., 1936, 43, 301-306.

25. FRERE JACQUE (M.) et HASENFRATZ (V.) -
C.R. Acad. Sci., 1949, 229, 848.

26. FRERE JACQUE (M.) et coll. - Réactions colorées et réactions de fluorescence des digitaliques.
Ann. Ph. Franç., 1963, 21, n°6, 509-528.

27. FREUDENBERG (K.), STOCKER (J.H.) et PORTER (J.) - Das kondensations prinzip der catechin.
Gerbstoffe Chem. Ber., 1957, 90, 957.

28. FREUDENBERG (K.) et WEINGES (K.) - Leuco - und pseudo verbindungen des anthocyanidine, Liebigs.
Ann. Chem., Dtsch., 1958, 613, 61-75.

29. GEISSMANN (T.A.) - The chemistry of flavonoids compounds.
Pergamon Press. éd., Oxford, London - New-York - Paris, 1962.

30. GREGOIRE (J.) - Contribution à l'étude du kinkéliba (Combretum micranthum G. DON).
Thèse, Doct. Pharm. Univ., Marseille, 1953.

31. HATWAY (D.E.) et SEAKINS (J.W.T.) - Autoxidation of polyphenols. Part. III. Autoxidation in Neutral aqueous solution of flavans related to catechin.
J. Chem. Soc., 1957, 1562-1566.

32. HATWAY (D.E.) - Autoxidation of polyphenols.
Part. IV. Oxidative degradation of the catechin - autoxidation polymer.
J. Chem. Soc., 1958, 520-521.

33. HECKEL (E.) - Répertoire de Pharmacie, 1891, 3, 246-254.

34. HELFTMANN (E.) et coll. - Identification of cardiac glucosides and aglycones in Strophantus seeds by paper chromatography.
Biochem. J., 1954, 50, 329-339.

35. HUTCHINSON (J.), DALZIEL (J.M.) et KEAY (R.W.J.) - Flora of West tropical Africa. Crown Agents for oversea Governements and administrations.
1er. éd., Londres, 1927-1936.

36. HUTCHINSON (J.) et DALZIEL (J.M.) - Flora of West tropical Africa. Crown. Agents for oversea Governements and administrations.
2e éd., Londres, 1954-1958.

37. JENTZSCH (K.), SPIEGL (P.) et FUCHS (L.) - Untersuchungen über die inhaltsstoffe der blätter von Combretum micranthum G. DON.
Planta medica, 1962, 10, n°1, 1-7.

38. JUSLEN (C.), WEHRLI (W.) et REICHSTEIN (T.) - Konstitution des Antiarigenins und des Antiosids Vorläufige Mitteilung.
Helv. chim. acta, 1962, 45, 2285.

39. KAISER (F.) - Chem. Ber., 1955, 88, 556.

40. KAUFMANN (H.), MULRADT (P.), REICHSTEIN (T.) - Differenzierung sämtlicher racemisomer 6-desoxyhexosen.
Helv. chim. acta, 1967, 50, 2287.

41. KEDDE (D.L.) - Thèse Pharm., Leyde, 1946.
Pharmac. Weekblad, 1947, 82, 741.

42. KERHARO (J.) - 'Pharmacopée sénégalaise traditionnelle". Plantes médicinales et toxiques.
1 vol. sous presse, éd. Vigot, Paris, 1973.

43. KERHARO (J.) - A propos de la flore sénégalaise : aperçu historique concernant les recherches sur la flore et les plantes médicinadu Sénégal.
Bull. I.F.A.N.Dakar, 1967, 29 A, n°4, 1391-1434.

44. KERHARO (J.) - Pharmacopées Africaines traditionnelles et Recherche scientifique.
Communic. 2e Congrès internat. Africanistes, Dakar, 1967,
Bull. Mém. Fac. Méd. Pharm., Dakar, 1967, 15,238-251.

45. KERHARO (J.) - Réalité et connaissance des pharmacopées traditionnelles de l'Afrique Noire.
Rapport au Symposium interafricain sur les Pharmacopées traditionnelles et les Plantes médicinales africaines.
Dakar, mars 1968.

46. KILIANI (H.) - Ueber den Milchsaft von Antiaris toxicaria Lesh.
Arch. Pharmazie, 1896, 234, 438-451.

47. KILIANI (H.) -
Ber. Deutsch. chem. Ges., 1910, 43, 3574.

48. LABORDE (J.) - Sur l'origine de la matière colorante des raisins rouges et autres organes végétaux.
C.R. Acad. Sci., 1908, 146, 1411.

49. LAFARGUE (A.) - Sur les hétérosides cardiotoniques : stéréochimie, mécanisme de quelques réactions. Chromatographie de partage sur papier.
Thèse Doct. Etat Pharm., Bordeaux, 1953.

50. LEBRETON (Ph.) - Contribution à l'étude des flavonoïdes chez Humulus Lupulus L. et autres Urticales.
Thèse Sciences, Lyon, 1962.

51. LEFEVRE (G.R.) - Contribution à l'étude anatomique et pharmacologique des Combrétacées.
Thèse Doct. Univ. Pharm., Paris, 1905.

52. LEHMANN (C.) - Kinkéliba, eine Westafrikanische droge.
Dissertation - Univ. Hamburg, 1943.

53. MAHEU (J.) et WEITZ (R.) - A propos des graines de Combrétacées vermifuges de Madagascar.
Bull. Sci. pharmacol., 1935, 42, 202-210.

54. MANNICH (C.) et SIEWERT (G.) -
Ber. Deutsch. chem. Ges., 1942, 75, 737.

55. MARTHOUD - Contribution à l'étude de l'emploi des dinitrobenzènes comme réactifs du groupement carbonyle.
Thèse Doct. Univ. Pharm., Lyon, 1935.

56. MARTIN (R.P.) et TAMM (Ch.) - Beitrag zur Konstitution des Antiarigenins.
Helv. chim. acta, 1959, 42, 696-712.

57. MASQUELIER (J.), MICHAUD (J.) et TRIAUD (J.) - Fractionnement des leucoanthocyannes du vin.
Bull. Soc. pharm., Bordeaux, 1965, 104, 81-85.

58. MASQUELIER (J.) et MICHAUD (J.) - Etat des leucoanthocyannes dans le rhytidome des Pinus maritima Lamk.
Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 1965, 104, 33-36.

59. MESNARD (P.) et LAFARGUE (A.) - Essai de séparation systématique de quelques hétérosides cardiotoniques par chromatographie de partage sur papier.
Ann. Pharm. Franç., 1954, 12, 285.

60. MESNARD (P.) et LAFARGUE (A.) - Sur une réaction spécifique des hétérosides et des génols digitaliques.
Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 1953, 3.

61. MESNARD (P.) et LAFARGUE (A.) -
Comm. Soc. chim. Fr., Bordeaux, 11 mai et 10 juillet 1953.

62. MESNARD (P.) et DEVEZE (J.) -
Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 1950, 109.

63. MESNARD (P.) et DEVAUX (G.) -
C.R. Ac. Sci., 1961, 253, 497.

64. MICHAUD (J.) - Evaluation densitométrique du taxifoliol dans le leucocyanidol de synthèse.
Comm. Soc. Pharm., Bordeaux, séance du 20.11.1968.

65. MICHAUD (J.), MASQUELIER (J.) - Synthèse du leucocyanidol monomère.
Bull. Soc. chim. Biol., 1968, 50, 7-8, 1346-1348.

66. MICHAUD (J.), LACAZE (P.) et MASQUELIER (J.) - Fractionnement des oligomères flavanoliques du raisin.
Bull. Soc. Pharm., Bordeaux, 1971, 110, 111-116.

67. MICHAUD (J.) et MASQUELIER (J.) - Quelques aspects nouveaux de la connaissance des tanins catéchiques. Leurs relations avec la vitamine C_2(P). Prod. et Prob.Pharm.,1973,28,n°7,499-520.

68. MUHR (H.), HUNGER (A.), REICHSTEIN (T.) - Die glycoside von Acokanthera friesiorum Markgr.
Helv. chim. acta, 1957, 37, 403-427.

69. MULDER (G.J.) -
J. pract. chem., 1838, 15, 419.

70. MULRADT (P.), WEISS (E.K.) et REICHSTEIN (T.) - Die cardenolide der samen von Antiaris toxicaria Lesh.
Helv. chim. acta, 1964, 47, 2164-2186.

71. OLIVIER (D.) et al. - Flora of tropical Africa.
Londres, 1868-1957.

72. PARIS (M.) - Contribution à l'étude biochimique de la Salicaire (Lythrum salicaria - L. lythracées).
Thèse Doct. Etat Pharm., Paris, 1966.

73. PARIS (R.) - Sur une combrétacée africaine, le Kinkéliba.
Bull. Sc. pharmacol., 1942, 49, 181-186.

74. PARIS (R.) et ETCHEPARE (Mlle S.) - Sur le "lespécapitoside", son identité avec l'homo-orientine.
C.R. Acad. Sci., 1964, 253, 6003-6005.

75. PATEL (M.B.) et ROWSON (J.M.) - Investigation of certain Nigerian medicinal plants. Part. I. Preliminary pharmacological and phytochemical screenings for cardiac activity.
Planta medica, 1964, 12, 33-42.

76. PELLETIER et CAVENTOU -
Ann. chim. phys. II. 26-57. in Kiliani (H.). Arch. Pharmazie, 1896, 234, 438.

77. PERROT (E.) - Matières premières usuelles du règne végétal.
2 vol. Masson et Cie éd., Paris, 1943.

78. PERROT (E.) et VOGT (E.) - Poisons de flèche et poisons d'épreuve.
1 vol. Vigot édit., Paris, 1913.

79. PESEZ (M.) et HERBAIN (M.) -
B.S.C., 1948, 104.

80. POPP (F.D.) et coll. -
Planta medica, 1968, 16, n°3, 343-347.

81. RABITZSCH (G.) -
J. of chromatography, 1969, 42, 146-148.

82. RAMSTAD (E.) -
Chem. and Industry, 1960, 177.

83. RAMSTAD (E.) et BEAL (J.L.) -
J. Pharm. pharmacol., 1960, 12, 552.

84. RAYMOND (W.D.) -
Analyst, 1939, 63, 478.
Analyst, 1939, 64, 113.

85. REICHSTEIN (T.) -
Planta medica, 1963, 11, 293.

86. REICHSTEIN (T.) et HUNGA (A.) -
Helv. chim. acta, 1950, 33, 76.

87. RIBEREAU-GAYON (P.) - Les composés phénoliques des végétaux.
Dunod éd., Paris, 1968.

88. RIBEREAU-GAYON (P.) - Le leucocyanidol dans les vins rouges.
C.R. Acad. Agric., 1957, 43, 197-596-598.

89. RIVOALEN (Mlle M.L.) - Contribution à l'étude pharmacologique de l'extrait fluide de kinkéliba.
Thèse Doct. Univ. Pharm., Marseille, 1945.

90. ROUX (D.G.) - Some recent advances in the identification of Leucoanthocyanins and the chemistry of condensed tannins.
Nature, 1957, 180, 973.

91. SCHNELL (R.) - La forêt dense. Introduction à l'étude botanique de la région forestière d'Afrique occidentale.
1 vol., P. Lechevalier éd., Paris, 1950.

92. SCHNELL (R.) - Etudes préliminaires sur la végétation et la flore des hauts plateaux du Mali (Fouta Djallon).
Bull. I.F.A.N., 1950, 905-926.

93. SELIGMANN (C.S.) -
J. of physiology, 1903, 29, 39.

94. SCHINDLER (O.), REICHSTEIN (T.) -
Helv. chim. acta, 1951, 34, 108.

95. SMITH (I.) - Chromatographic and electrophoretic techniques.
2 vol.,W.Heinemann éd., London, 1960.

96. SWAIN (T.) -
Biochem. J., 1952, 53, 200.

97. SWAIN (T.) - Leucocyanidin, chem. and Ind., 1954, 1114-1145.

98. TAYLOR (D.A.H.) - A blowpipe dart poison from North-Borneo.
Brit. J. pharmacol., 1953, 8, 237.

99. TROCHAIN (J.) - Contribution à l'étude de la végétation du Sénégal.
Mém. I.F.A.N., Paris, 1940, n°2.

100. TSCHESCHE (R.) et HAUPT (W.) - Ber. Deutsch. chem. Ges., 1936, 69, 1377.

101. VALETAS (J.) - Contribution à l'étude du Kinkéliba (Combretum micranthum G. DON).
Thèse Doct. univ. Pharm., Toulouse, 1939.

102. WEHRLI (W.), SCHINDLER (O.) et REICHSTEIN (T.) - Die Glykoside des Milchsaftes von Antiaris toxicaria Lesch aus Malaya sowie von Antiaris africana Engl aus Kenya. Isolierungen.
Helv. chim. acta, 1962, 45, 1083.
Helv. chim. acta, 1963, 46, 117.

A D D I T I F

1 (bis). ABRAHAM (R.J.) - Nuclear magnetic resonance Spectroscopy.
in Pridham (J.B.), Methods in Polyphenol chemistry, Pergamon Press ed., London, 1964.

2 (bis). AUBREVILLE (A.) - Climats, forêts et désertification de l'Afrique tropicale.
Soc. d'éditions géographiques maritimes et coloniales.
Paris, 1949.

3 (bis). AUBREVILLE (A.) - Flore forestière soudano-guinéenne. AOF. Cameroun. AEF. Soc. d'éditions géographiques, maritimes et coloniales. Paris, 1950.

4 (bis). CARELLI (V.), LIQUORI (A.M.) - Sorption chromatography of polar substances on polyamides.
Nature, 1955, 176, 70-71.

5 (bis). CHOPIN (J.) - Les C-glycoflavonoïdes. In Mentzer (C.).
Actualités de Phytochimie fondamentale, Masson et Cie éd.,1966.

6 (bis). DEYSSON (G.) - Eléments d'anatomie des plantes vasculaires.
Société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, 1965.

7 (bis). GAIMENT-LEBLOND (J.) - Contribution à l'étude des plantes médicinales d'AOF et d'AEF.
Thèse Doct. Univ. Pharm., Paris, 1957.

8 (bis). HARBORNE (J.B.) - The chromatographic identification of anthocyanins pigments.
J. of chromatography, 1958, 1, 473.

9 (bis). HARBORNE (J.B.) - Ultraviolet spectroscopy of polyphenols.
In Pridham (J.B.) : Methods in polyphenol chemistry, Pergamon Press éd., Londres, 1964.

10 (bis). HORHAMMER (L.) - Polyamide chromatography of flavonoïds and anthraquinones. In Pridham (J.B.) : Methods in polyphenol chemistry. Pergamon Press éd., Londres, 1964.

11 (bis). JURD (L.) - Spectral properties of flavonoids compounds. In Geissmann (T.A.), The chemistry of flavonoids compounds, Pergamon Press éd., New-York, 1962.

12 (bis). MABRY (T.J.), MARKHAM (K.R.) et THOMAS (M.B.) - The systematic identification of flavonoïds. Spronder Verlag ed., Berlin - Heidelberg - New-York, 1970.

13 (bis). MASSICOT (J.) et MARTHE (J.P.) - RMN de produits naturels. III. Etude de quelques dérivés flavoniques et substances apparentées. Bull. Soc. chim. Fr., 1962, 1962-1970.

14 (bis). METCALFE (C.R.) et CHALK (L.) - Anatomy of the Dicotyledons. 1er vol., Clarendon Press éd., Oxford, 1950.

15 (bis). ROBERTY (G.) - Régions naturelles de l'Afrique tropicale occidentale. Bull. I.F.A.N., 1960, 22, série A, n°1, 95.

16 (bis). TRAORE (D.) - Médecine et Magie africaines. Présence africaine, éd., Paris, 1965.

17 (bis). WAGNER (H.) - Infrared Spectroscopy of flavonoïds. In Pridham (J.B.), Methods in polyphenol chemistry, Pergamon Press éd., Londres, 1964.

18 (bis). WAGNER (H.) - Flavonoid C.glycosides. In Swain (T.). Comparative phytochemistry. Academic Press éd., Londres, 1966.

---

* (18) - LEMESLE (R.), ROUSSEAU (Mlle J.), DAFFE (M.), SCHEEMAEKER (H.).- Etude morphologique et anatomique d'Antiaris africana Engl. (Moracées).

LEMESLE (R.), ROUSSEAU (Mlle J.), DAFFE (M.), LAPLACE (J.P.).- Etude morphologique et anatomique du Combretum glutinosum Perr (Combrétacées).

Communications Soc.Ph.Bordeaux - Séance du 10 mai 1972.

Editions BERGERET - 71-73 rue Leyteire - Bordeaux - Tél. 91.12.59 -

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

LA CHIMIOTHERAPIE ANTITUBERCULEUSE

Vu,
Le Président de
l'UNIVERSITE DE Bordeaux II
H. BRICAUD

Bon à imprimer
Le Président de Thèse :
P. MESNARD

Vu et permis d'imprimer
Bordeaux, le 19 novembre 1973
Le Chancelier des Universités :
R. PAULIAN